Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

APOCHLOROSE DURCH HÖHERE TEMPERATUR BEI EUGLENA GRACILIS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Peter Brandt
aus Bernburg/Saale

Göttingen 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0051

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

APOCHLOROSE DURCH HÖHERE TEMPERATUR BEI EUGLENA GRACILIS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Peter Brandt
aus Bernburg/Saale

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof.Dr.W.Wießner

Korreferent: Prof.H.Lorenzen

Tag der mündlichen Prüfung: 12.Februar 1976

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
2.	Methoden	7
2.1.	Versuchsobjekte und Kulturbedingungen	7
2.2.	Isolierung der Chloroplasten	8
2.3.	Extraktion und Nachweis der Reinheit der plastidären DNS	9
2.4.	Extraktion und gelelektrophoretische Auftrennung der Plastidenproteine	1o
2.5.	Einbau radioaktiver Isotope	1o
2.6.	Elektronenmikroskopische Methoden	11
2.7.	Analytische Untersuchungsmethoden	11
2.8.	Zellzählung	11
2.9.	Chloroplastenzählung	12
3.	Ergebnisse	13
3.1.	Methode zur Erzeugung farbloser Euglenen	13
3.1.1.	Synchronisation	13
3.1.2.	Wirkung höherer Temperatur	15
3.1.2.1.	Wirkung höherer Temperatur in Abhängigkeit vom physiologischen Entwicklungszustand	15
3.1.2.2.	Wirkung höherer Temperatur in Abhängigkeit von der Zellteilungsrate	23
	a)Erhöhung der Lichtintensität auf 16ooo Lux	23
	b)Veränderung der Temperatur	29
	c)Veränderung des Kulturmediums	32
3.2.	Einfluß der organischen Kohlenstoffquelle auf die Wärmebehandlung	36
3.3.	Durch Einwirkung höherer Temperatur bewirkte cytologische Veränderungen bei Euglena gracilis	44
3.4.	Der Einfluß externer Faktoren auf das "Realisationssystem"der genetischen Information im Chloroplasten	47

3.4.1.	Der Einfluß von Licht+höherer Temperatur auf die Synthese plastidärer DNS	48
3.4.2.	Der Einfluß der höheren Temperatur auf die Synthese der Plastidenproteine	61
3.4.3.	Veränderungen in der Synthese und dem Bestand an Plastidenproteinen während der Wärmebehandlung	88
3.4.4.	Einfluß der höheren Temperatur auf die RNS plastidärer und nukleärer Herkunft	91
4.	Diskussion	94
5.	Zusammenfassung	1o3
6.	Literaturverzeichnis	1o5

Verzeichnis der Abkürzungen und verwendeten Begriffe

a) Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
CAP	Chloramphenicol (Handelsname: Paraxin)
CHM	Cycloheximid (ß-(2-(3,5-Dimethyl-2-oxo-cyclohexyl)-2-hydroxyl)(Handelsname: Actidion)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DST	Stunde während der Dunkelzeit des Zellcyclus
LST	Stunde während der Lichtzeit des Zellcyclus
RNS	Ribonukleinsäure
Std.	Stunde

b) Verwendete Begriffe:

Plastidenproteine	Proteine, die für die Struktur und Funktion der Chloroplasten notwendig sind
plastidäre Proteine	Proteine, die im Plastom codiert sind
nukleäre Proteine	Proteine, die im Genom codiert sind
Plastom	Genetische Information der gesamten Chloroplasten einer Zelle
Genom	Genetische Information des Kerns
S_k-Faktor	Änderung des Chlorophyllgehalts in v.H. des Ausgangsmaterials (ganze Kultur) dividiert durch die Dauer der Wärmeeinwirkung
S_z-Faktor	Änderung des Chlorophyllgehalts in v.H. des Ausgangsmaterials (Einzelzelle) dividiert durch die Dauer der Hitzeeinwirkung

1.Einleitung

Apochlorotische Zellen der normalerweise grünen Euglena gracilis wurden erstmals von Zumstein (19oo) beschrieben. Sie treten,wie neuere Untersuchungen von Robbins,Hervey und Stebbins (1953) ergeben haben,in der Natur mit einer Mutationsrate von 1 : 25ooo auf.Die Züchtung farbloser Klone aus isolierten farblosen Einzelzellen gelang erst= mals 1912 im Labor von Klebs der Forscherin C.Ternetz, die in der gleichen Arbeit auch eine schwach grün gefärb= te "Zwischenform",deren Nachkommenschaft aus einem Gemisch grüner,schwach grüner und farbloser Zellen bestand, beschrieb.

Die irreversible Apochlorose einer gesamten Zellpopulation von Euglena gracilis kann künstlich,d.h. durch Anwendung von Giften oder durch UV-Bestrahlung,erreicht werden.Die Wirkungsweise der Gifte und der UV-Bestrahlung ist zum größten Teil bekannt:die Antibiotika Streptomycin (23,24, 25,28,33,34,51,52,67,72,76,83,88,91,96),Kanamycin (27,28) und Erythromycin (9,26,28) hemmen die Proteinsynthese an den Ribosomen;Nitrofurantoin (31,64,66) greift selektiv in die plastidäre DNS-Synthese ein;Chloramphenicol (63,7o) hemmt die Proteinsynthese in den Chloroplasten;Colicin E2 (84) wirkt auf die Struktur der Chloroplasten-DNS ein; Nalidixinsäure (29,58) hemmt spezifisch die Replikation bakterieller DNS und vermutlich auf gleiche Weise die Re= plikation plastidärer DNS;auf ähnliche Weise wirken die

Antibiotika Rubiflavin (3o),Mitomycin (32) und Myxin (65). Ebenso wie die letzgenannten Gifte verhindert die UV-Bestrahlung die Realisation der im Plastom codierten Information (13,4o,59,6o).

Die experimentelle Erzeugung apochlorotischer Formen von Euglena gracilis auf natürliche Weise,d.h. ohne den Gebrauch von Giftstoffen oder durch UV-Bestrahlung,gelang erstmals E.G.Pringsheim (1952) mit einer Wärmebehandlung und Cook (1974) mit einer speziellen Kultivierungsmethode bei 3o°C,mit der er über die Entwicklungshemmung der Proplastiden einen irreversiblen Verlust der Fähigkeit zum Ergrünen erreichte. E.G.Pringsheim kultivierte die Organismen bei einer Temperatur von 34° bis 35°C und isolierte nach 5 bis 6 Tagen gebleichte Zellen aus einem Gemisch verschieden intensiv grün gefärbter Zellen.Einige dieser gebleichten Zellen ergrünten wieder unter normalen Bedingungen und waren schließlich nicht mehr von der Wildform zu unterscheiden,andere hingegen hatten die Fähigkeit zum Ergrünen vollständig verloren.Habituell sind diese farblosen Euglenen nicht von denen durch Einwirkung von Giften oder durch UV-Bestrahlung erzeugten zu unterscheiden. Ungeklärt war bis heute allerdings die zur Apochlorose führende Wirkungsweise dieser Wärmebehandlung . Die Pringsheimsche Methode zur Herstellung farbloser Euglenen hat den Nachteil,daß niemals die gesamte Zellpopulation durch den Einfluß der Wärmebehandlung in apo-

chlorotische Formen verwandelt werden kann:stets liegt ein Gemisch verschieden stark "entfärbter" Zellen vor.Die Annahme liegt nahe,daß diese Unterschiede auf das verschiedene Zellalter und den damit verbundenen unterschiedlichen physiologischen Entwicklungszustand der Zellen in der Normalkultur zurückgehen und daß die Wärmebehandlung nur zu ganz bestimmten Zeitpunkten im Entwicklungszyklus der Einzelzelle zur Ausbleichung führt.Die Untersuchungen von Lorenzen (1959,1963) haben eine solche entwicklungsbedingte thermosensible Phase im Generationszyklus einzelliger Algen,z.B. bei Chlorella pyrenoidosa, wahrscheinlich gemacht.Zur Analyse des Mechanismus der Erzeugung apochlorotischer Mutanten von Euglena gracilis durch Wärmebehandlung wurde a)der Entwicklungszyklus von Euglena gracilis auf thermosensible Abschnitte hin überprüft,wurden b)die experimentellen Bedingungen zur Erzeugung ganzer Populationen einheitlich gebleichter Zellen von Euglena gracilis standardisiert und c)die während der Erzeugung apochlorotischer Zellen von Euglena gracilis ablaufenden molekularbiologischen Vorgänge aufgedeckt.

2. Methoden

2.1. Versuchsobjekte und Kulturmethoden

Versuchsobjekte dieser Arbeit waren die Stämme T (Nr.1224-5/9), V (Nr.1224-5/1o) und Z (Nr.1224-5/25) von Euglena gracilis, die die Sammlung für Algenkulturen des Pflanzenphysiologischen Institutes Göttingen zur Verfügung stellte. Zur Erhaltung der Stämme wurden axenische Schragagarkulturen (Tageslicht, Zimmertemperatur) benutzt, deren Medium folgende Zusammensetzung hatte: 0,1% Na-Acetat; o,1% Fleischextrakt; o,2% Bactotrypton; o,2% Hefeextrakt; 1,5% Agar (Pulveragar DIFCO). Der pH-Wert dieses Mediums liegt bei 7,o.

Zur Massenkultur von Euglena gracilis wurde die folgende Nährlösung verwendet:

NH_4Cl	1,2o	g
K_2HPO_4	o,19	g
KH_2PO_4	o,o6	g
$MgSO_4.7H_2O$	o,o5	g
$CaCl_2.2H_2O$	o,o15	g
H_3BO_3	o,1o	mg
$ZnSO_4.7H_2O$	o,1o	mg
$MnSO_4.4H_2O$	o,o22	mg
$NaMoO_4.2H_2O$	o,o1	mg
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	o,o1	mg
$CuSO_4.5H_2O$	o,o5	mg
$FeSO_4.7H_2O$ (als EDTA-Komplex)	7,o	mg
Vitamin B_1	o,2	mg
Vitamin B_{12}	o,o2	mg
H_2O bidest.	ad 1ooo	ml

Der pH-Wert dieser Nährlösung liegt bei 7,o.Die Nährlösung wurde zunächst ohne Vitamine bei 2 Atm. autoklaviert und nach anschließender Vitaminzugabe im Dampftopf sieben Minuten lang bei 1oo°C erhitzt.

Als Kulturanlage diente der von Lorenzen (1959) beschriebene Lichtthermostat.In ihm wurden die Algen bei 27°C und einem Licht-Dunkelwechsel von 14:1o Std. kultiviert.Die Beleuchtungsstärke betrug 9ooo Lux.Begast wurde mit einem Luft-CO_2-Gemisch (1,5 Vol% CO_2).

Zur Wärmebehandlung wurden der Synchronkultur Proben entnommen und in einem Wasserbad konstanten,höheren Temperaturen ausgesetzt (Temperaturangabe jeweils im Text).Die Wärmebehandlung erfolgte im Dauerlicht (Beleuchtungsstärke jeweils im Text angegeben).Während der Wärmebehandlung wurde mit Druckluft ohne CO_2-Zusatz begast.Als Kohlenstoffquelle wurde jeder Kultur zu Versuchsbeginn entweder Glucose oder Athanol oder Na-Acetat zugesetzt.

Zur Untersuchung der Zellteilungsraten und des Chlorophyllgehalts während der Wärmebehandlung wurden außerdem die folgenden beiden Kulturmedien verwendet:a)vollheterotrophes Medium: o,o5% Pepton;o,o2% Hefeextrakt; o,o1% Na-Acetat b)heterotrophes Mangelmedium: 1% Glucose;o,o1M KH_2PO_4; o,o1M $MgCl_2$.

2.2.Isolierung der Chloroplasten

Die Chloroplasten von Euglena gracilis wurden in Anlehnung an die Methode von Brawermann (1963) und Jagendorf (1955)

isoliert:Algenkulturen wurden abzentrifugiert,gewaschen und in kalter ($4^{o}C$) 1o% Saccharoselösung (mit o,o1M Tris--Puffer;o,oo4M $MgCl_2$;pH 7,6) aufgeschwemmt.Die Zellen wur=den in einer Yeda-Presse (Scientific Instruments,Rehovot-Israel) aufgebrochen und das Zellhomogenat anschließend vorsichtig in ein zu zwei Drittel mit einer Mischung aus 43% Saccharose und Glycerin (im Verhältnis 3:5) gefülltes Cellulosenitratzentrifugenröhrchen einpipettiert,sowie 3o Min. in der Ultrazentrifuge Omega 6o ooo (Firma Christ, Osterode) zentrifugiert (1oo ooo x g).Die Chloroplasten lagen danach als grüne,scharf abgesetzte Bande an der Grenzfläche zum Gemisch aus 43% Saccharose und Glycerin vor und wurden mittels einer Spritze abgesaugt.

2.3.Extraktion und Nachweis der Reinheit der plastidären DNS

In Anlehnung an die Methode von Brawermann und Eisenstadt (1964b) wurden die isolierten Chloroplasten in 1o% Saccha=roselösung (mit o,o1M Tris-Puffer;o,oo4M $MgCl_2$;o,oo1M ß-Mercaptoäthanol;pH 7,5) aufgenommen und Na-Desoxycholat (Endkonzentration 5%) zugefügt.Nach einer Inkubationszeit von 3o Min. wurde dieses Gemisch der gebräuchlichen Phenol--Kresol-Extraktion unterworfen,um native Plastiden-DNS zu erhalten.Die Reinheit der plastidären DNS wurde im Cäsium=chlorid-Dichtegradienten nach Manning et al. (1971) und durch Eluieren an der MAK-Säule nach Chiang und Sueoka (1967) nachgewiesen.

2.4. Extraktion und gelelektrophoretische Auftrennung der Plastidenproteine

Nach der Methode von Klein und Vernon (1974) wurden isolierte Chloroplasten von Euglena gracilis in 8o% Aceton bei -1o°C extrahiert und dann über Nacht in einem o,o1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,o) inkubiert,der SDS (1%) und Mercaptoäthanol (1%) enthält.

Jeweils 1o bis 6o µl dieser Lösung (5o µg Protein) wurden direkt zum Auftragen auf die Gele (5%) verwendet.

Zur Auftrennung der Proteine wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Anlehnung an Weber und Osborne (1969) und Shapiro,Vinuela und Maizel (1967) angewandt.Die Absorption längs des Gels wurde bei λ 27onm mit dem Chromoscan MK.II der Firma Joyce,Loebl & Co.LTD, England aufgezeichnet.

2.5. Einbau radioaktiver Isotope

Zu Markierungsversuchen wurden (8-^{3}H)-Adenin und L-(U-^{14}C)--Leucin verwendet (bezogen vom Radiochemical Centre, Amersham/England).

In der Regel wurden die Algen in Warburggefäßen im Warburgapparat (Firma Braun,Melsungen) nach einer Adaptationszeit mit den radioaktiven Isotopen 1 Stunde lang inkubiert, dann sofort abzentrifugiert und nach einmaligem Waschen in wenig kalter Saccharoselösung aufgenommen (siehe 2.2.).

Die Bestimmung der Einbauraten des radioaktiven Adenins und/oder Leucins erfolgte im Liquid Scintillation Spectro=

meter,Model 245o Tri-Card (Packard Instruments Company, Illinois,USA).Als Szintillationsflüssigkeit wurde Aquasol, Universal L.S.C.-Cocktail (Firma NEN Chemicals,Dreieichenhain) verwendet.

2.6.Elektronenmikroskopische Methoden

Zur Anfertigung von Ultradünnschnitten wurden die Zellen mit 4% Glutaraldehyd behandelt und anschließend mit gepuffertem Osmiumtetroxid (Palade 1952) fixiert.Die Eponeinbettung erfolgte nach Luft (1961),Nachkontrastierung der Schnitte nach Reynolds (1963).

2.7.Analytische Untersuchungsmethoden

a.Gesamtchlorophyll:Bestimmung nach Mackinney (1941) durch Extraktion mit 96%igem Methanol und Messung der Extinktion bei λ 65o und 665 nm im Zeiss Spektralphotometer (PM QII)

b.Protein:Bestimmung nach der Mikro-Kjeldahl-Methode (Bradstreet 1965)

c.Desoxyribonukleinsäure:Bestimmung nach der von Ruppel (1962) modifizierten Methode von Ceriotti (1952)

d.Ribonukleinsäure:Extraktion nach der Methode von Schwartzbach,Freyssinet und Schiff (1974)

2.8.Zellzählung

Die Ermittlung der Zellzahl/ml Algensuspension erfolgte mit Hilfe der Zählkammer nach Thoma.Es wurden jeweils zehn Parallelproben ausgezählt und die Zählergebnisse gemittelt.

Durch Multiplikation dieser "relativen Zellzahl" n mit dem Faktor $1{,}56 \times 10^4$, der sich aus dem Flüssigkeitsvolumen der Zählkammer ergibt, erhält man die absolute Zellzahl, d.h. die Zellzahl/ml Algensuspension. Zu Beginn der Lichtzeit wurde die Algenkultur in der Regel auf die relative Zellzahl von 10 eingestellt. Die jeweils einzuimpfende Menge an x ml Algensuspension errechnet sich nach der Formel

$x = \frac{10 \cdot N}{A - 10}$, wobei A die ausgezählte Zellzahl der Vorkultur und N die Menge an frischer Nährlösung in ml ist. Vor dem Auszählen wurden die Euglenen jeweils mit einem Tropfen HCl abgetötet, um die Eigenbeweglichkeit auszuschalten.

2.9. Chloroplastenzählung

Die Anzahl der Chloroplasten pro Zelle wurde in vivo mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Ortholux der Firma Leitz, Wetzlar) bestimmt (Erregerlichtfilter BG 12; Sperrfilter K 530 bzw. K 490).

3. Ergebnisse

3.1. Methode zur Erzeugung farbloser Euglenen

3.1.1. Synchronisation

Als Ausgangsmaterial für die Synchronisation diente eine Dauerlichtkultur, die zu Versuchsbeginn (Zeitpunkt o) auf eine Zelldichte von $o,15 \times 1o^5$ Zellen/ml Algensuspension eingestellt und einem Licht-Dunkel-Wechsel von $14:\overline{1o}$ Stunden (Edmunds 1964; Cook 1966) ausgesetzt wurde. In einem Licht-Dunkel-Wechsel von $16:\overline{8}$ Stunden, wie er von Cook und James (1966) zur Synchronisation verwandt wurde, erwies sich die Dunkelzeit als zu kurz; sie reichte für eine 1oo%ige Teilung des Zellmaterials nicht aus. In den ersten beiden auf die Dauerlichtbehandlung folgenden $14:\overline{1o}$ - Licht-Dunkel-Wechseln war die Teilungsrate in den Dunkelzeiten größer als in den Lichtzeiten (Abb. 1a). Vollsynchronisation und damit Beschränkung der Zellteilung auf die Dunkelperiode war erst nach dem 2. Licht-Dunkel-Wechsel erreicht. Im Verlauf mehrerer Zellzyklen wurde außerdem der Teilungsschub auf eine kürzere Zeitspanne eingeengt (Abb. 1b). Er setzte schließlich in der 3. Dunkelstunde ein und war nach der 8. Dunkelstunde beendet. Die Gesamtzeit des Teilungsschubes reduzierte sich dadurch auf 5 Stunden.

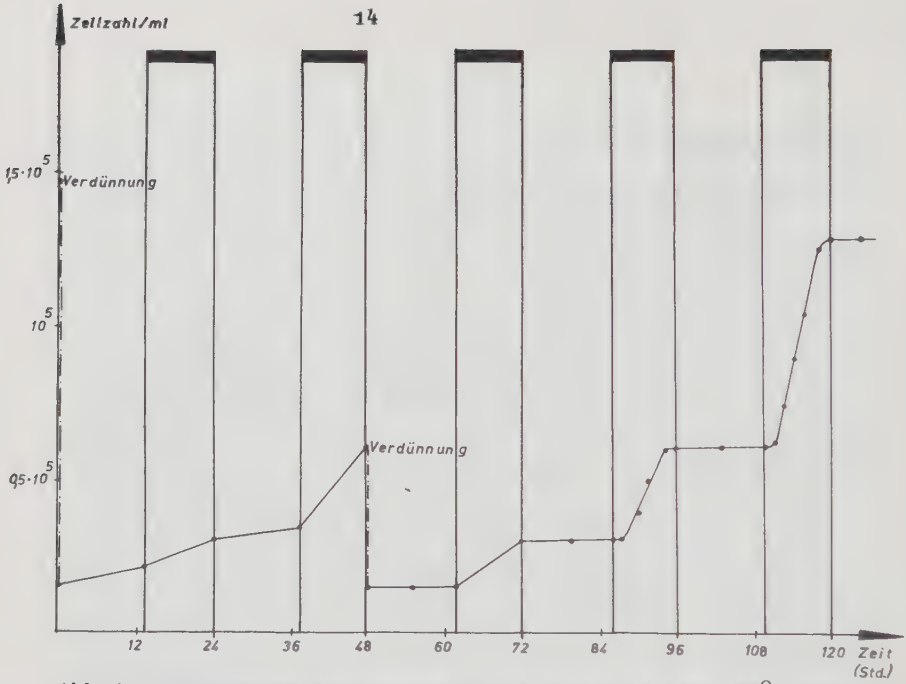

Abb.1a Wachstumsverlauf von Euglena gracilis (bei 27°C und 9ooo Lux) vor und nach Erreichen der Vollsynchronisation

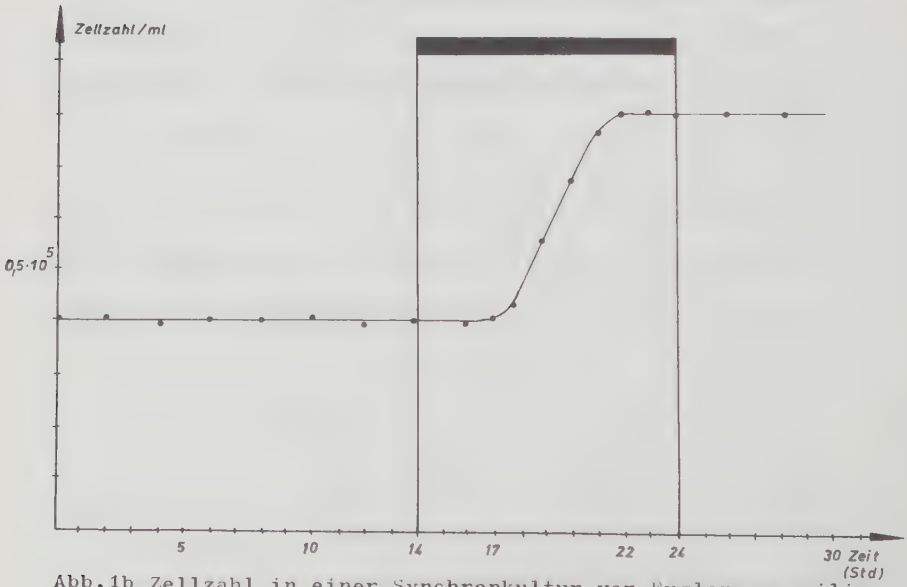

Abb.1b Zellzahl in einer Synchronkultur von Euglena gracilis nach 15maligem Licht-Dunkel-Wechsel von 14:1oStd.

3.1.2.Wirkung höherer Temperatur

3.1.2.1.Wirkung höherer Temperatur in Abhängigkeit vom physiologischen Entwicklungszustand

Nach E.G.Pringsheim ist für die experimentelle Erzeugung farbloser Euglenen eine Temperatur von 34° bis 35°C notwendig (1952).Daher wurde zuerst der Einfluß einer Temperatur von 35°C auf die Zellen geprüft.Hierzu wurden der Synchronkultur während eines Zellzyklus stündlich Proben entnommen und in ein Wasserbad von 35°C überführt.Die Wärmebehandlung erfolgte im Dauerlicht (14oo Lux) und dauerte 12o Stunden.Ihre Wirkung auf den Chlorophyllgehalt der zu verschiedenen Zeitpunkten aus der Synchronkultur entnommenen Proben war sehr unterschiedlich (Abb.2 bis 4;in drei Abbildungen aufgeteilt,um die Übersicht zu erleichtern). Insgesamt ließen sich vier verschiedene,durch die höhere Temperatur bedingte Arten der Zu- bzw. Abnahme des Chlorophyllgehalts während der Wärmebehandlung beobachtem:

1.Die Temperaturerhöhung hat keinen Einfluß auf den Chlorophyllgehalt;während der gesamten Zeitspanne der Wärmebehandlung nimmt derselbe kontinuierlich zu.Hierzu gehören z.B. die Proben aus der 9.,1o. und 11.LST+.

2.An einen Abschnitt anfänglichen Absinkens im Chlorophyllgehalt schließt sich eine Phase der Chlorophyllzunahme an, die jedoch wieder in einen Abschnitt der Chlorophyllabnahme übergeht.Hierzu gehören z.B. die Proben aus der 3.,4.,12.,

+Im folgenden Text bedeutet: LST Stunde in der Lichtzeit
DST Stunde in der Dunkelzeit

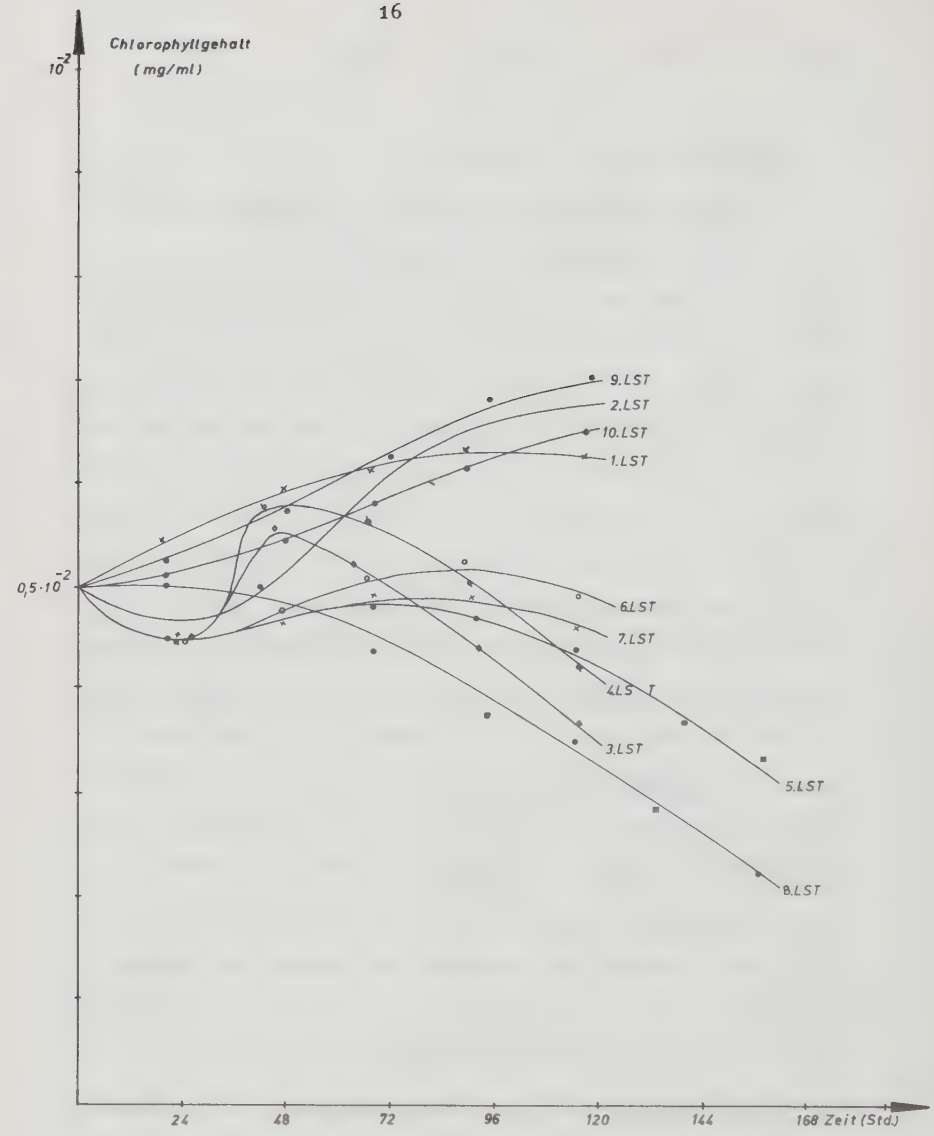

Abb.2

Veränderung des Chlorophyllgehalts von zehn zu verschiedenen Zeitpunkten einer Synchronkultur von Euglena gracilis entnommenen Algenproben. Temperatur 35°C; Dauerlicht 1400 Lux; Zusatz von Glucose zu Versuchsbeginn.

Entnahmezeit: 1. bis 10. Stunde der Lichtzeit (LST)

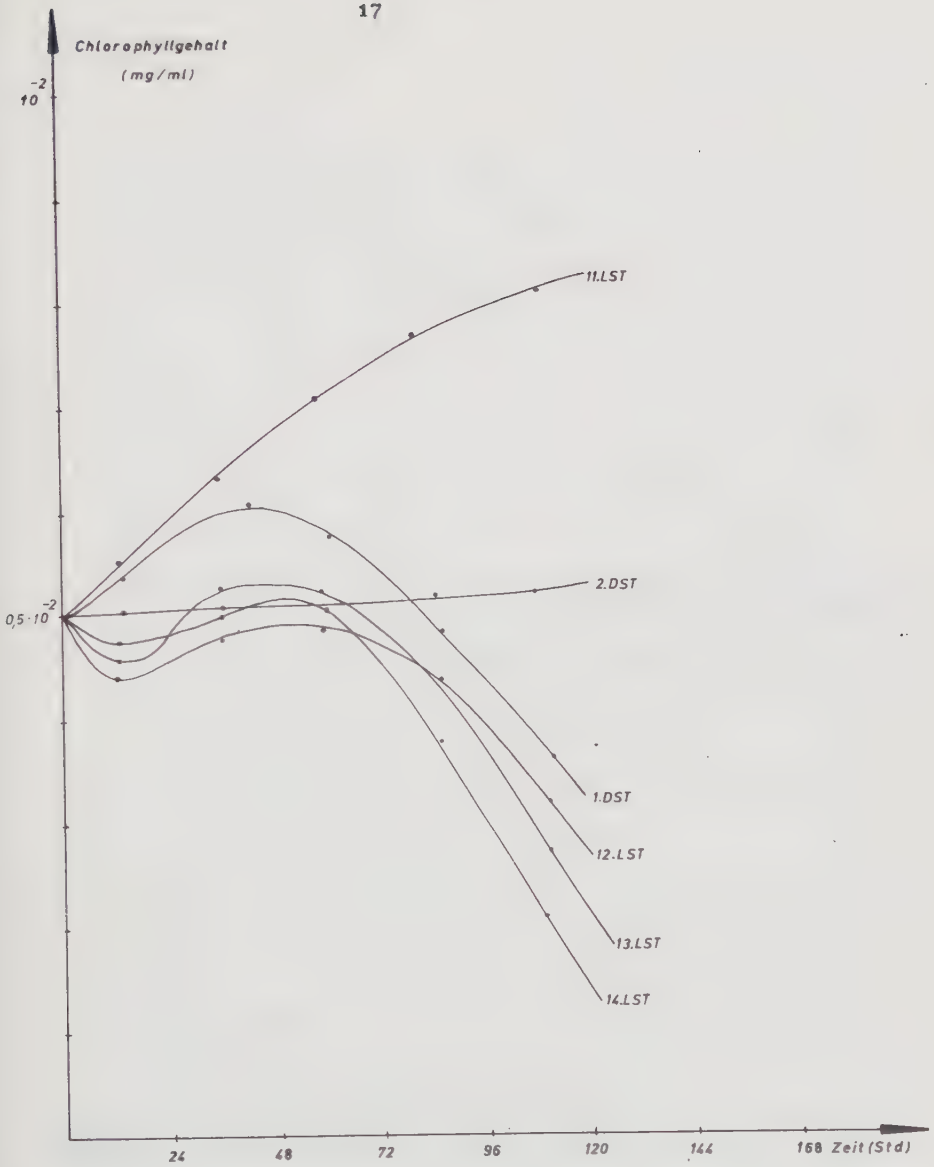

Abb.3

Veränderung des Chlorophyllgehalts von sechs zu verschiedenen Zeitpunkten einer Synchronkultur von Euglena gracilis entnommenen Algenproben. Temperatur 35°C; Dauerlicht 1400 Lux; Zusatz von Glucose zu Versuchsbeginn.

Entnahmezeit: 11. bis 14. Stunde der Lichtzeit (LST)
1. bis 2. Stunde der Dunkelzeit (DST)

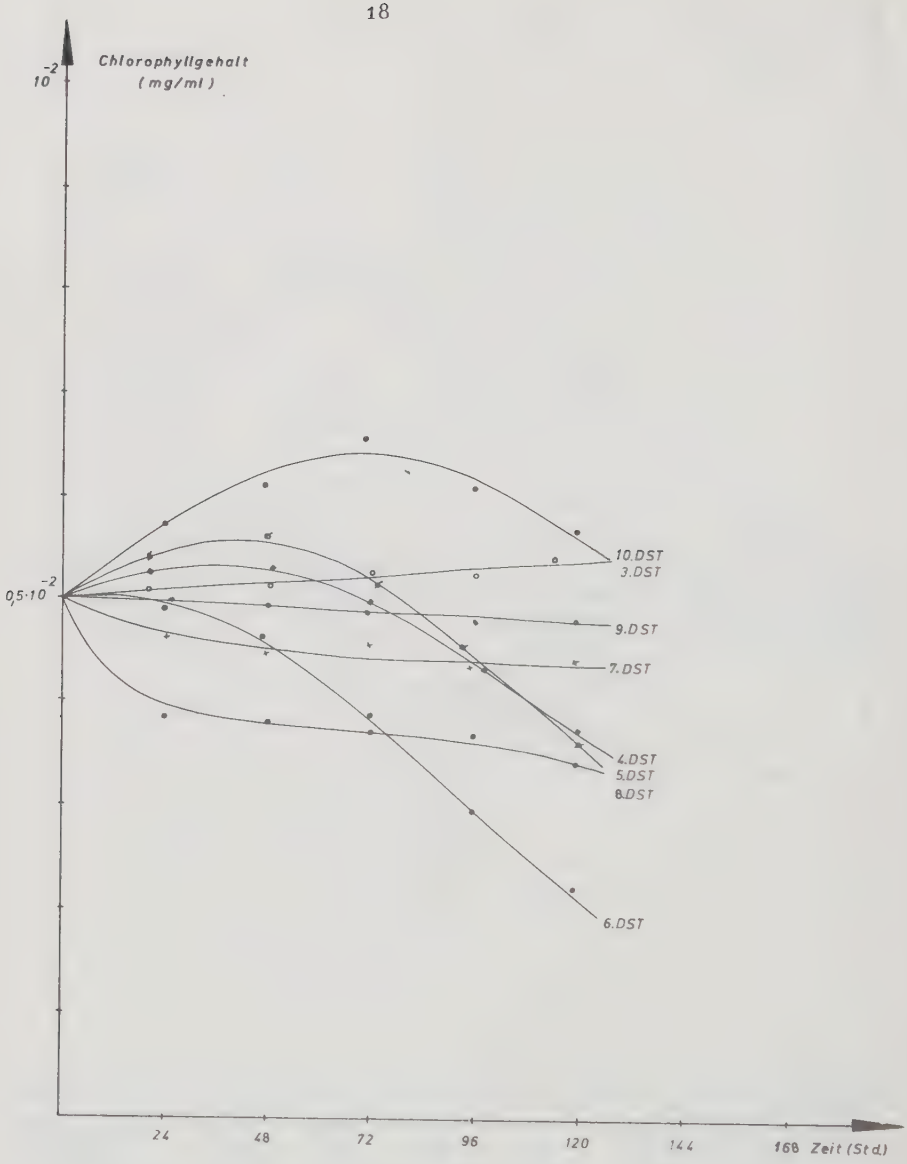

Abb.4

Veränderung des Chlorophyllgehalts von acht zu verschiedenen Zeitpunkten einer Synchronkultur von Euglena gracilis entnommenen Algenproben. Temperatur 35°C; Dauerlicht 1400 Lux; Zusatz von Glucose zu Versuchsbeginn.

Entnahmezeit: 3. bis 10. Stunde der Dunkelzeit (DST)

13. und 14.LST.

3.Nach einer anfänglichen Zunahme sinkt der Chlorophyll=gehalt ab.Hierzu gehören die Proben aus der 1. und 4.DST.

4.Mit Beginn der Wärmebehandlung sinkt der Chlorophyll=gehalt kontinuierlich ab.Hierzu gehören die Proben aus der 8.LST und 6.DST.

Um die Übersicht über Chlorophyllzu- oder -abnahme während des Zellzyklus zu erleichtern,wird in dieser Arbeit für die jeweilige Gesamtkultur ein sog. Sensibilitätsfaktor (S_k-Faktor) eingeführt(S=Sensibilität des Chlorophylls auf Wärmebehandlung bei bestimmter Lichtintensität und Temperatur;K=Kultur),der die Änderung des Chlorophyllge=halts in v.H. des Ausgangsmaterials (=x),dividiert durch die Kulturdauer von 12o Stunden ausdrückt:

$$S_k = \frac{x \cdot 1o}{12o} \quad (Std.^{-1})$$

(Der Zahlenwert 1o wurde in die Formel eingefügt,um für den S_k-Faktor Werte >O zu erhalten.)

Positive S_k-Faktoren spiegeln eine Chlorophyllzunahme,nega=tive S_k-Faktoren eine Chlorophyllabnahme der Gesamtkultur wider.Je größer der absolute Wert des S_k-Faktors ist,desto größer ist auch die Änderung des Chlorophyllgehalts der Gesamtkultur.Der S_k-Faktor läßt die Änderung der Zellzahl während der Wärmebehandlung unberücksichtigt.

Die errechneten S_k-Faktoren der 24 Einzelkulturen (stünd=liche Probenentnahme bei 24stündigem Zellzyklus) wurden in Tabelle 1 zusammengefaßt.Abbildung 5 zeigt graphisch die S_k-Faktoren im Laufe des Zellzyklus von Euglena gra=cilis.

Tabelle 1:

Berechnung des Sensibilitätsfaktors (bei 35°C, 14oo Lux)

Der Chlorophyllgehalt betrug zu Versuchsbeginn jeweils o,5oo.1o^{-2}mg/ml.

Entnahme-zeit	Chlorophyllgehalt nach 12o Std. (mg/ml)x1o^{-2}	Differenz (mg/ml)x1o^{-2}	%	S_k-Faktor
1.LST	o,62o	+o,12o	+24	+2,o
2.LST	o,65o	+o,15o	+3o	+2,5
3.LST	o.35o	-o,15o	-3o	-2,5
4.LST	o,4oo	-o,1oo	-2o	-1,7
5.LST	o,4oo	-o,1oo	-2o	-1,7
6.LST	o,49o	-o,o1o	- 2	-o,1
7.LST	o,45o	-o,o5o	-1o	-o,8
8.LST	o,33o	-o,17o	-34	-2,8
9.LST	o,68o	+o,18o	+36	+3,o
1o.LST	o,63o	+o,13o	+26	+2,2
11.LST	o,9oo	+o,4oo	+8o	+6,7
12.LST	o,28o	-o,22o	-44	-3,8
13.LST	o,21o	-o,29o	-58	-4,8
14.LST	o,14o	-o,36o	-72	-6,o
1.DST	o,33o	-o,17o	-34	-2,8
2.DST	o,52o	+o,o2o	+ 4	+o,3
3.DST	o,54o	+o,o4o	+ 8	+o,7
4.DST	o,375	-o,125	-25	-2,o
5.DST	o,365	-o,135	-27	-2,2
6.DST	o,225	-o,275	-55	-4,6
7.DST	o,44o	-o,o6o	-12	-1,o
8.DST	o,34o	-o,16o	-32	-2,7
9.DST	o,48o	-o,o2o	- 4	-o,3
1o.DST	o,57o	+o,o7o	+14	+1,2

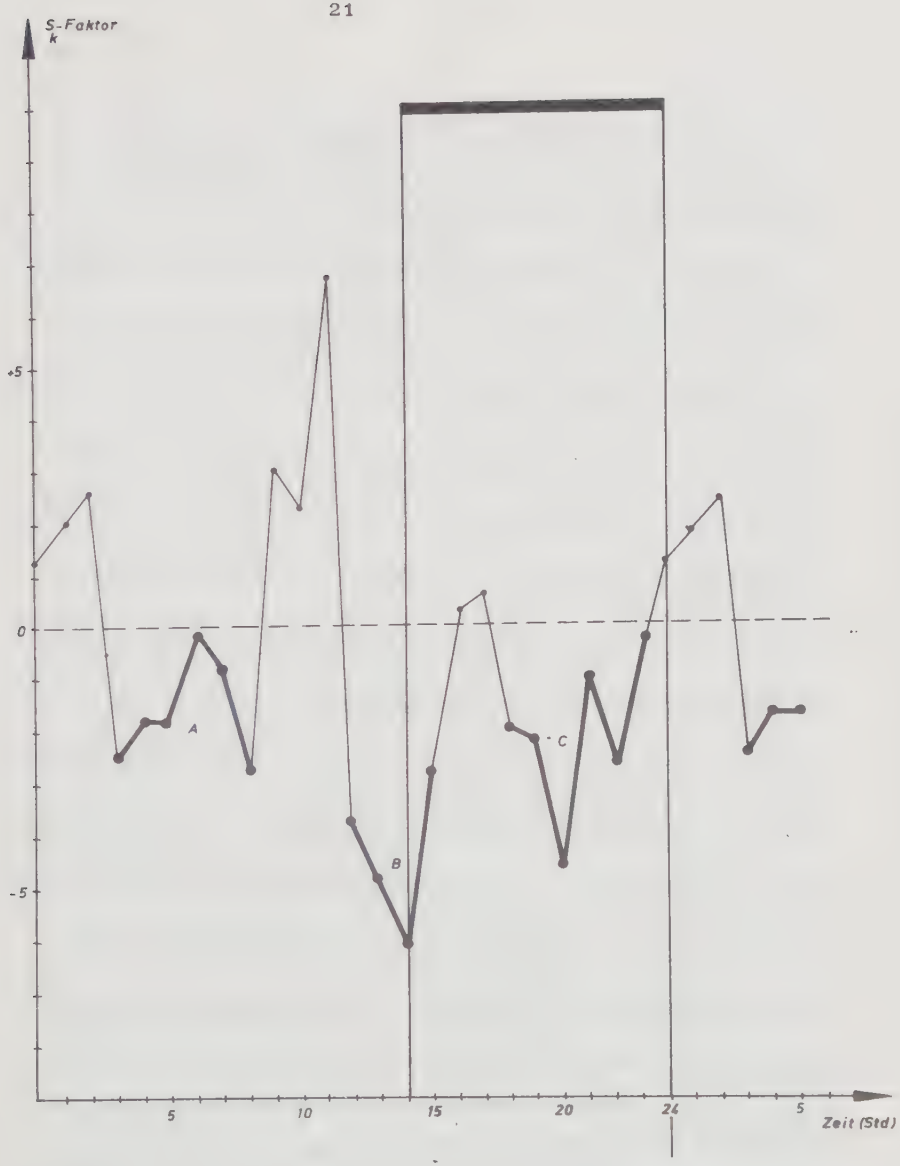

Abb. 5

Sensibilität einer Synchronkultur von Euglena gracilis (Temperatur : 35°C ;Beleuchtungsstärke : 1400 Lux)
Die thermosensiblen Abschnitte wurden besonders hervorgehoben.

Am Ende der Wärmebehandlung bestehen die in den mit A,B und C gekennzeichneten Abschnitten der Synchronkultur entnommenen Proben aus einem Gemisch normal grüner,teilweise gebleichter sowie weißer Zellen.Sie dienten als Ausgangsmaterial,aus dem die gebleichten Zellen vom übrigen Zellmaterial abgetrennt wurden.Dabei erwies sich folgende Verfahrensweise als die günstigste:

Nach der Wärmebehandlung von 12o Stunden wird das Zellgemisch 5 Tage lang bei 27°C dem 14:$\overline{1o}$-Licht-Dunkel-Wechsel ausgesetzt und mit dem normalen Luft-CO_2-Gemisch (1,5 Vol%) begast.Am 6.Tag wird die Mischkultur 12 Stunden lang verdunkelt und nicht mehr belüftet.Daraufhin trennt sich das Zellmaterial innerhalb dieser 12 Stunden:die grünen Zellen befinden sich in einer dichten Schicht am Boden,die gebleichten Zellen in einer gelblich-weißen Zone in dem oberen Drittel der Kulturröhre.Zellmaterial dieser gelblich-weißen Zone wird anschließend 12o Stunden lang einer nochmaligen Wärmebehandlung bei 35°C unterworfen.Als Resultat liegt anschließend eine farblose,vollständig chlorophyllfreie Kultur von Euglena gracilis vor.

Dieses Trennverfahren ist jedoch nicht zu jedem Zeitpunkt während der Synchronisation erfolgreich,sondern nur bei Zellmaterial aus den Bereichen A und B,wobei Zellen aus dem Abschnitt A geeigneter sind,da ein großer Teil der gebleichten Euglenen aus dem Abschnitt B durch die 2.Wärmebehandlung geschädigt wird.

Im Abschnitt C,in dem ebenfalls ein Zellgemisch aus gebleich-

ten,partiell gebleichten und grünen Zellen vorliegt,gelingt die Trennung der grünen von den weißen Zellen nur unvollkommen.Die Zellen dieses Abschnittes zeigen außerdem eine besonders starke Tendenz zum Wiederergrünen.

3.1.2.2.Wirkung höherer Temperatur in Abhängigkeit von der Zellteilungsrate

Nachdem es somit gelungen war,erstmals Massenkulturen farbloser Euglenen experimentell durch Wärmebehandlung zu erzeugen,ist das bisher beschriebene Verfahren zur Erzeugung apochlorotischer Zellen insgesamt jedoch umständlich und zeitraubend.Für die genaue Analyse des durch die Wärmebehandlung hervorgerufenen Ausbleichens von Euglena gracilis ist es daher wenig geeignet.Daher mußte versucht werden, die Methode durch Veränderungen experimenteller Parameter zu verbessern:

a)Erhöhung der Lichtintensität auf 16 ooo Lux

Das Zellmaterial für den Bleichungsvorgang wurde der Synchronkultur in den bereits bekannten,vorher ermittelten sensiblen Bereichen des Zellzyklus (A,B,C,d.h. zur 5.und 14.LST sowie zur 6.DST) entnommen.Abweichend von der bisherigen Versuchseinstellung wurde außerdem das Ausgangsmaterial auf unterschiedliche Zelldichten eingestellt (Zellzahlen Tab.2). Den Verlauf der Chlorophyllabnahme - bezogen auf die Zellzahl - während des Ausbleichens von vier Proben unterschiedlicher Anfangszellzahl fassen die Abbildungen 6 bis 8 zusammen.Bei der Beurteilung dieser Daten ist davon auszugehen,

daß die Zellzahl in der Kultur d (das ist die Kultur mit geringster Anfangszellzahl)am stärksten zugenommen hatte (Tabelle 2).Dementsprechend ist hier der Quotient Chloro= phyllgehalt/Zellzahl am weitesten abgesunken.Dies bedeutet, daß die Abnahme des Chlorophyllgehalts nicht nur auf den Abbau vorhandenen Chlorophylls zurückzuführen ist,sondern auch auf eine mangelhafte Chlorophyllsynthese in den jungen Euglenen.

Am günstigsten erwies sich für die Bleichbehandlung Zell= material aus dem Bereich A,d.i. zur 5.LST entnommenes Ma= terial (Abb.6).Hier liegt nach einer 12oostündigen Warmebe= handlung bei einer Beleuchtungsstärke von 16ooo Lux eine vollkommen weiße Kultur vor,während das Zellmaterial der zur 14.LST (Bereich B,Abb.7) und 6.DST (Bereich C,Abb.8) aus der Synchronkultur entnommenen Proben bei vergleich= barer Anfangszellzahl und fast gleicher Teilungsrate aus einem Gemisch weißer,teilweise gebleichter und grüner Zel= len zusammengesetzt ist.Das gleiche gilt für das Probenma= terial,das zur 5.LST,14.LST und 6.DST der Synchronkultur entnommen wurde und dessen Ausgangszellzahl höher lagen. Damit ist zur 5.LST der Synchronkultur von Euglena gracilis entnommenes Zellmaterial das günstigste Ausgangsmaterial mit einer unter den genannten Versuchsbedingungen 1oo%igen Ausbleichrate (Warmebehandlung bei $35^{o}C$,12o Stunden lang; Dauerlicht 16ooo Lux;Anfangszellzahl kleiner als $o,14.1o^{5}$ Zellen/ml Algensuspension).Im Unterschied zu dem bei einer Beleuchtungsstarke von 14oo Lux der Wärmebehandlung unter= worfenen Zellmaterials war eine 2.Wärmebehandlung nicht mehr notwendig.

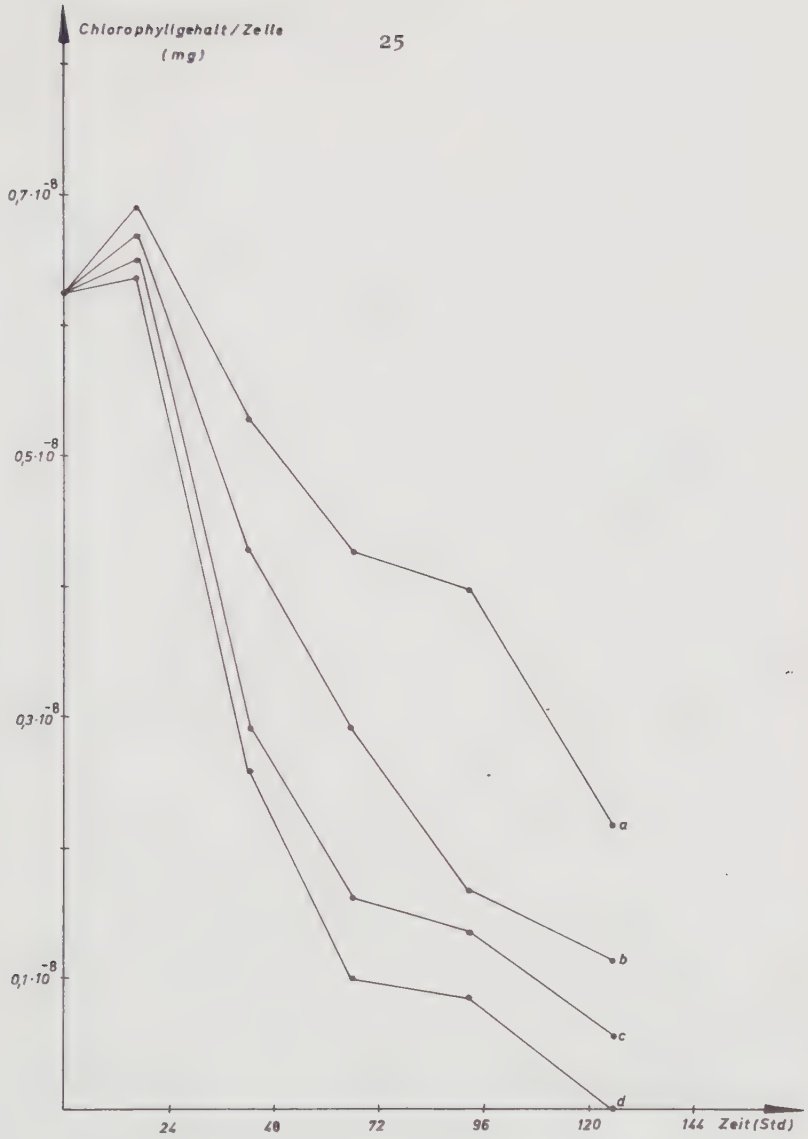

Abb.6

Verlauf des Ausbleichvorgangs von 4 zur 5.LST entnommenen Zellproben unterschiedlicher Zelldichte; 34,25°C; 16000 Lux; Zusatz von Glucose zu Versuchsbeginn.
Anfangszellzahl:
a: $1{,}56.1o^5$; b: $o{,}62.1o^5$; c: $o{,}31.1o^5$; d: $o{,}12.1o^5$
(Jeweils bezogen auf 1ml Algensuspension)

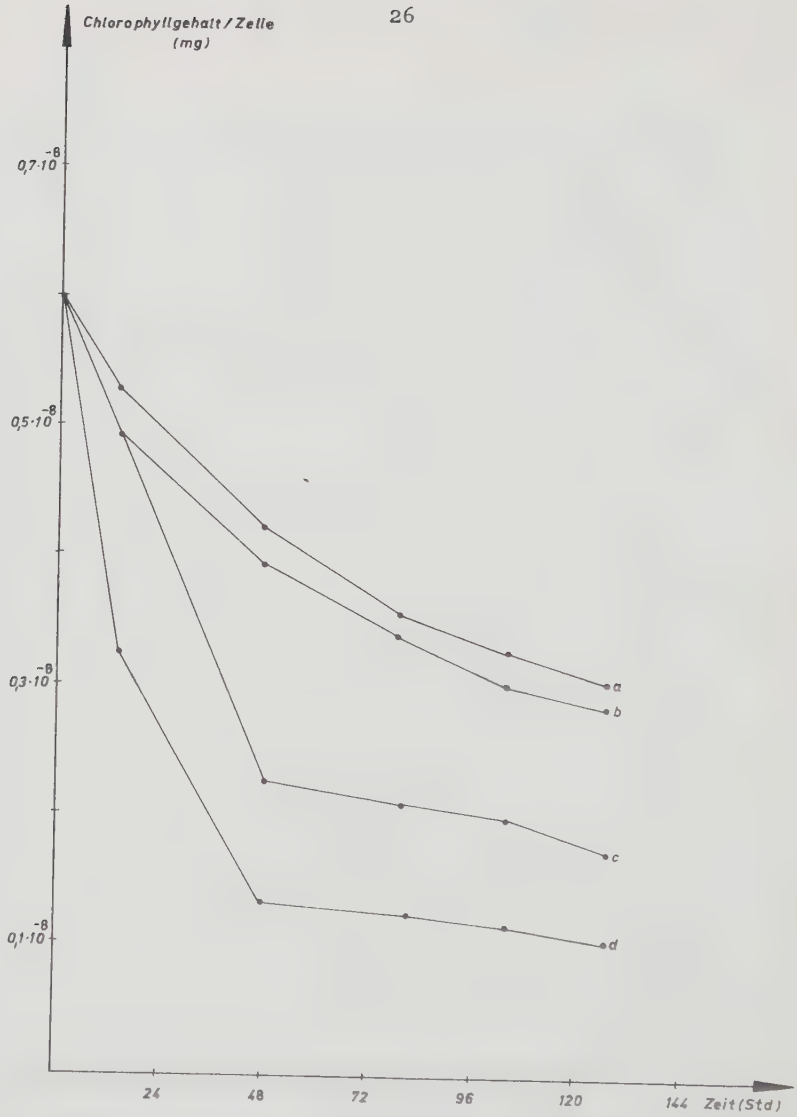

Abb.7

Verlauf des Ausbleichvorgangs von 4 zur 14.LST entnommenen Zellproben unterschiedlicher Zelldichte; 34,25°C; 16000 Lux; Zusatz von Glucose zu Versuchsbeginn
Anfangszellzahl:
a: $1{,}30.10^5$; b: $0{,}78.10^5$; c: $0{,}16.10^5$; d: $0{,}13.10^5$
(Jeweils bezogen auf 1 ml Algensuspension)

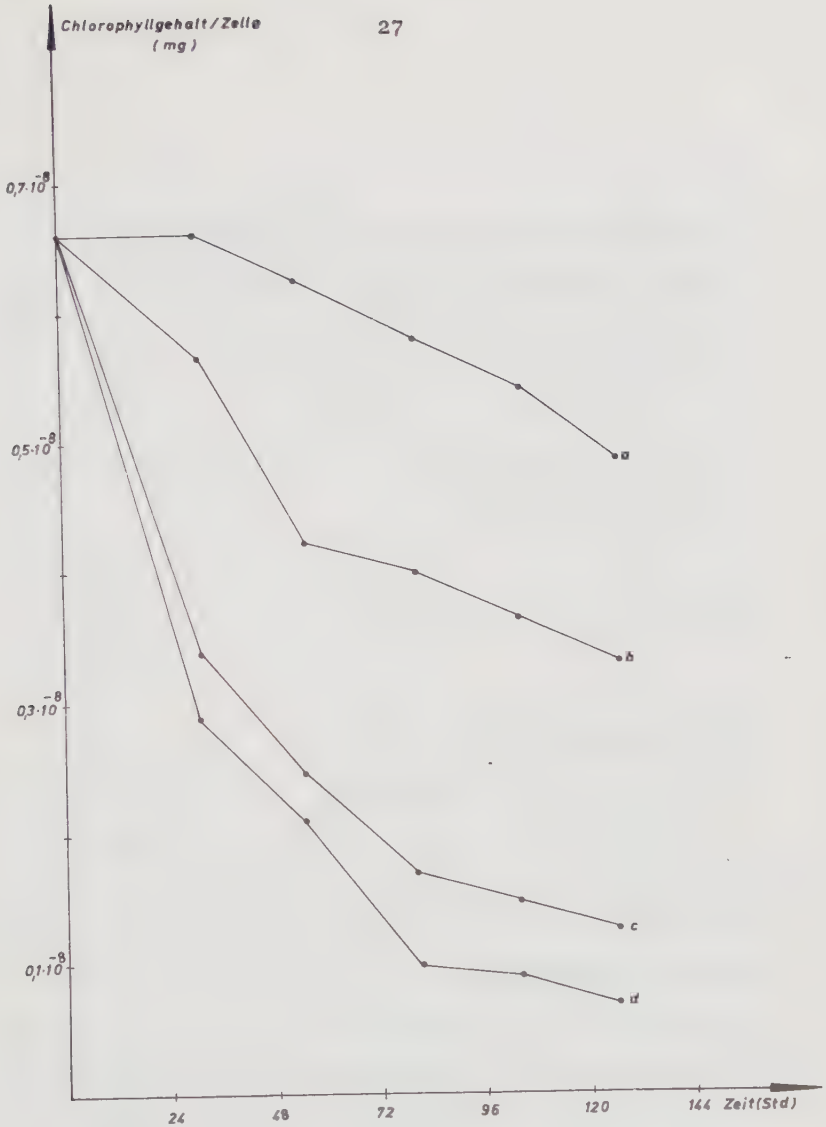

Abb.8

Verlauf des Ausbleichvorgangs von 4 zur 6.DST entnommenen Zellproben unterschiedlicher Zelldichte; 34,25°C;16ooo Lux;Zusatz von Glucose zu Versuchsbeginn.
Anfangszellzahl:
a: $1,64.1o^5$;b: $o,62.1o^5$;c:$o,31.1o^5$;d: $o,16.1o^5$
(Jeweils bezogen auf 1 ml Algensuspension)

Tabelle 2:

Anstieg der Zellzahl während der Wärmebehandlung

(34,25 ± o,25°C; 16ooo Lux; Zugabe von Glucose (1%) zu Versuchsbeginn)

	Anfangszellzahl (A)	Endzellzahl (E)	E/A
1. Proben aus der 5. LST			
a.	$1{,}56o \cdot 1o^5$	$4{,}o6 \cdot 1o^5$	2,7
b.	$o{,}624 \cdot 1o^5$	$4{,}o6 \cdot 1o^5$	6,5
c.	$o{,}312 \cdot 1o^5$	$3{,}28 \cdot 1o^5$	1o,5
d.	$o{,}12o \cdot 1o^5$	$2{,}5o \cdot 1o^5$	2o,8
2. Proben aus der 14. LST			
a.	$1{,}295 \cdot 1o^5$	$3{,}74 \cdot 1o^5$	2,9
b.	$o{,}784 \cdot 1o^5$	$2{,}96 \cdot 1o^5$	3,8
c.	$o{,}156 \cdot 1o^5$	$3{,}12 \cdot 1o^5$	2o,o
d.	$o{,}125 \cdot 1o^5$	$2{,}81 \cdot 1o^5$	22,5
3. Proben aus der 6. DST			
a.	$1{,}638 \cdot 1o^5$	$4{,}58 \cdot 1o^5$	2,8
b.	$o{,}624 \cdot 1o^5$	$2{,}81 \cdot 1o^5$	4,5
c.	$o{,}312 \cdot 1o^5$	$3{,}81 \cdot 1o^5$	12,2
d.	$o{,}156 \cdot 1o^5$	$3{,}59 \cdot 1o^5$	23,o

b) Veränderung der Temperatur

Diese Versuche wurden bei der im vorigen Abschnitt ermittelten optimalen Lichtintensität von 16ooo Lux und geringer Anfangsdichte ($\leq 1{,}4 \cdot 10^4$ Zellen/ml) durchgeführt. Damit wurden mit Ausnahme der Temperatur - es wurde der Temperaturbereich von 31°C bis 37°C untersucht - die bisher als optimal ermittelten Versuchsbedingungen beibehalten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 graphisch dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Proben aus der 5.LST, 14.LST und 6.DST blieben auch in diesem Fall erhalten. Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse wurde der sogenannte S_z-Faktor eingeführt:

$$S_z = \frac{-x \cdot 1o}{n.t} \quad (\text{Std.}^{-1})$$

(-x = Chlorophyllabnahme in %; n = Zellzahl pro ml Algensuspension; t = Zeit der Wärmebehandlung = 12o Std.)

Bei Verwendung des S_z-Faktors wird im Gegensatz zum S_k--Faktor nicht nur die Änderung des Chlorophyllgehaltes während der Wärmebehandlung, sondern auch die Änderung der Zelldichte berücksichtigt. Er bedeutet praktisch die Änderung des Durchschnittswertes im Chlorophyllgehalt pro Einzelzelle und läßt eine bessere Beurteilung des Bleichzustandes - der Apochlorose - zu. Da es sich bei der Erzeugung der Apochlorose stets um eine Chlorophyllabnahme handelt, hat der S_z-Faktor immer negative Werte.

Die graphische Abbildung 9 zeigt eindeutig,daß das Sensi= bilitatsoptimum im Temperaturbereich zwischen 34°C und 35°C liegt.Bei Temperaturen unter 34°C ist der Bleich= effekt weniger stark ausgeprägt;bei Temperaturen ober= halb 35°C treten eine deutliche Hemmung der Zellteilung und lethale Schädigung auf.

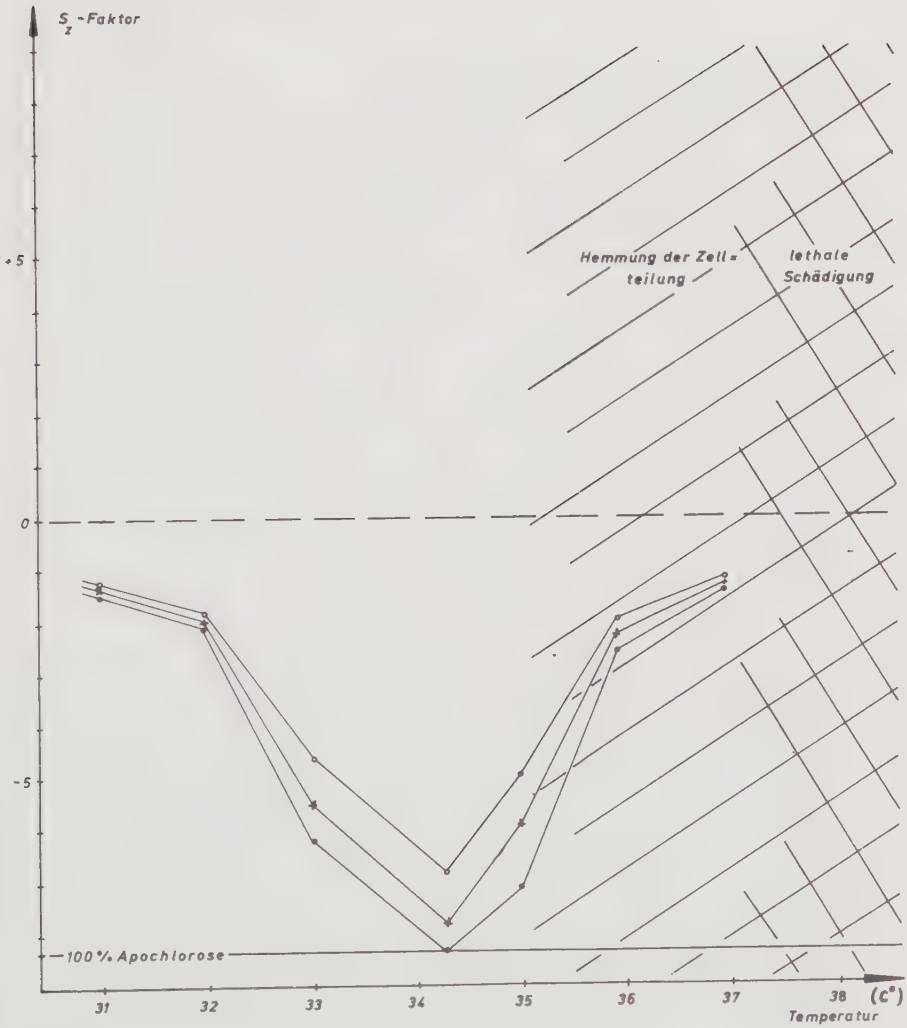

Abb.9

Änderung des durchschnittlichen Chlorophyllgehalts einer Einzelzelle nach 12o Stunden Wärmebehandlung;Temperaturbereich 31° bis 37°C;16ooo Lux;Glucosezusatz zu Versuchsbeginn. Entnahmezeit: 5.LST•;14.LST•;6.DST+.

c) Veränderung des Kulturmediums

Die Ergebnisse des vorigen Abschnittes legen die Vermutung nahe, daß die höhere Kultivierungstemperatur während der Bleichbehandlung nur dann bei allen Organismen einer Kultur die Apochlorose herbeiführt, wenn neben der Hemmung der Chlorophyllsynthese (und möglicherweise dem Abbau schon vorhandenen Chlorophylls) zusätzlich eine bestimmte Mindestzahl an Zellteilungen erreicht wird. Zur Klärung dieser Frage wurden Euglenen zur 5. LST aus dem anorganischen Medium, in dem sie synchronisiert worden waren, in a) ein "vollheterotrophes Medium"+ oder b) ein "heterotrophes Mangelmedium"+ überführt oder es wurde c) dem anorganischen Synchronisationsmedium Glucose zugesetzt+. Während einer Dauer von 15o Stunden wurden der Chlorophyllgehalt und die Zellzahl von Kulturen in den oben angegebenen Medien (bei 35°C) und von einer Kontrollkultur (anorganisches Medium + Glucosezusatz, 27°C) bestimmt. Die Veränderungen des Chlorophyllgehalts und der Zellzahl sind in den Abbildungen 1o und 11 wiedergegeben. Während der Chlorophyllgehalt der Kontrollkultur (1a) während der 15o Stunden ansteigt, zeigt die Kultur im "vollheterotrophen Medium" (2) bis zur 8o. Stunde eine leichte Zunahme des Chlorophyllgehalts, der zum Ende der Temperaturbehandlung jedoch wieder auf seinen Anfangswert zurückfällt. Im "heterotrophen Mangelmedium" (3)

+ Nähere Angaben über die Zusammensetzung der Medien siehe Seite 8

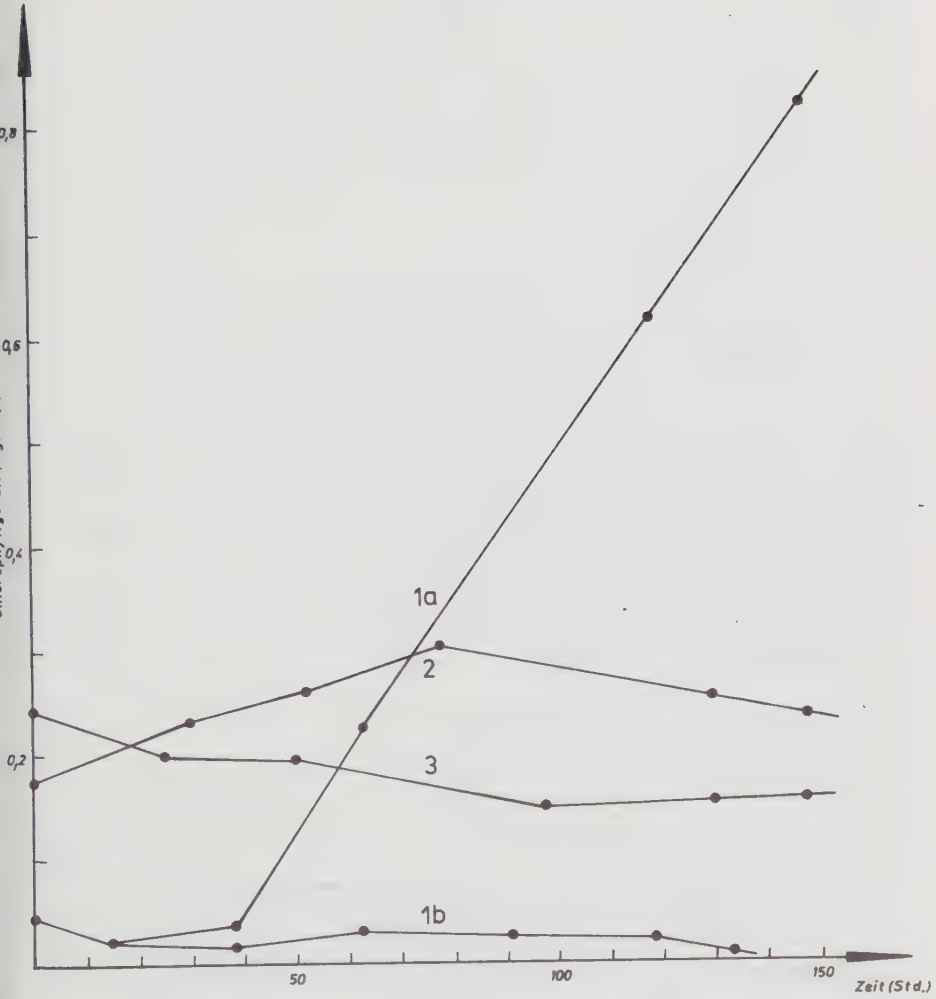

Abb.1o

Veränderung des Chlorophyllgehalts von vier zur 5.LST einer Syn= chronkultur von Euglena gracilis entnommenen Algenproben Dauerlicht 1o oooLux; 1a anorganisches Medium mit Glucosezusatz bei 27°C; 1b anorganisches Medium mit Glucosezusatz bei 35°C; 2 "vollheterotrophes Medium" bei 35°C; 3 "heterotrophes Mangel= mdium bei 35°C; Zusammensetzung der Medien siehe S.8

sinkt der Chlorophyllgehalt in den ersten 3o Stunden geringfügig auf einen Wert ab,der bis zum Ende der Tempe= raturbehandlung beibehalten wird.Lediglich in der Kultur im anorganischen Medium mit Glucosezusatz (1b) ist am Ende der Temperaturbehandlung kein Chlorophyll mehr vor= handen.

Im heterotrophen Mangelmedium (3) geht der nach 15ostündi= ger Kultur bei 35°C fast unveränderte Chlorophyllgehalt/ml Algensuspension mit einer fast konstanten Zellzahl einher, d.h. die Zellen haben sich während 15o Stunden bei 35°C nicht geteilt und der Chlorophyllgehalt/Zelle ist kon= stant geblieben.Die Kontrollkultur (1b) weist nach 15o Std. fast den gleichen Chlorophyllgehalt/Zelle auf;während dieser Zeit lief die Chlorophyllneusynthese ab und die Zellen teil= ten sich durchschnittlich vier- bis fünfmal.Im anorgani= schen Medium mit Glucosezusatz (1b) bei 35°C ist die Zell= teilungsrate der Kultur zwar etwas geringer,da aber keine Chlorophyllneusynthese stattfindet,sinkt der Chlorophyll= gehalt/Zelle schnell ab.Zwar wird dieser Chlorophyllgehalt pro Zelle auch von der Kultur in"vollheterotrophem Medium" (2)erreicht,doch reduziert sich hier dieser Wert durch eine verhältnismäßig starke Zellteilung bei gleichzeitig zwar schwacher,aber dennoch vorhandener Chlorophyllneusyn= these.Euglenen dieser Kultur zeigten eine sehr starke Ten= denz zum Wiederergrünen.

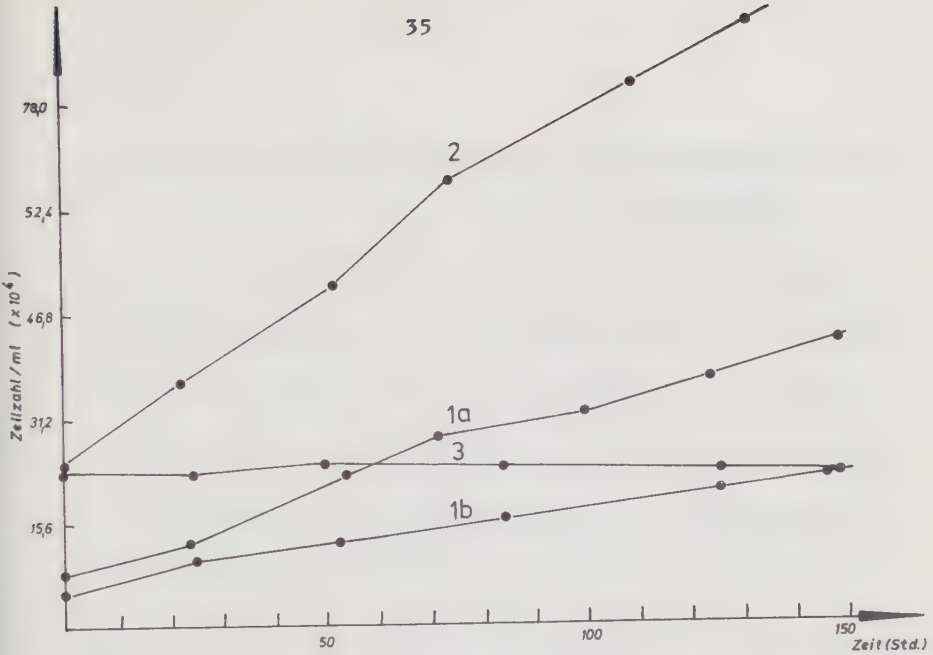

Abb.11a

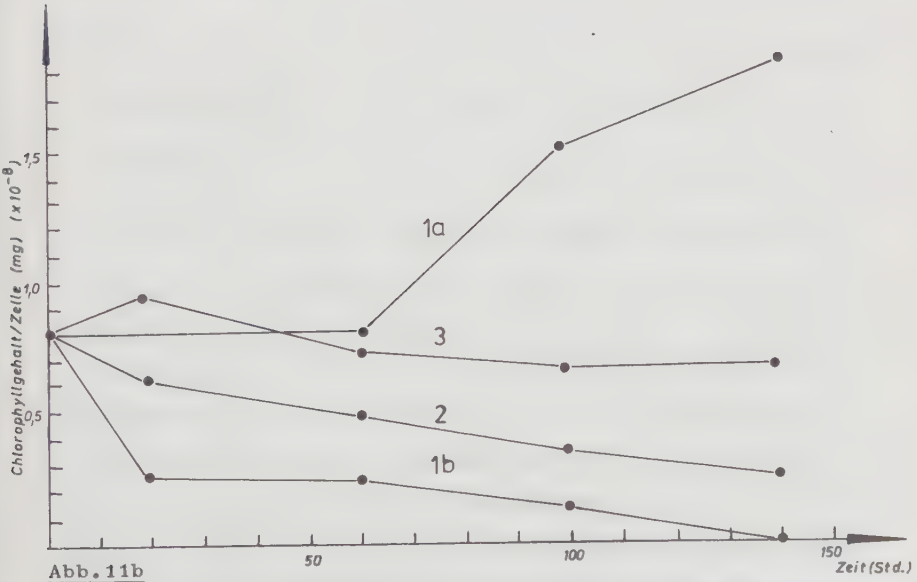

Abb.11b

Abb.11a u. b Veränderung der Zellzahl/ml bzw. des Chlorophyll=gehalts/Zelle von vier zur 5.LST einer Synchron=kultur von Euglena gracilis entnommenen Algenproben (Kulturbedingungen siehe Legende von Abb.1o)

3.2. Einfluß der organischen Kohlenstoffquelle auf die Wärmebehandlung

Da grüne Euglenen während der Wärmebehandlung neben der phänotypischen Umwandlung zu apochlorotischen Zellen, bedingt durch den Übergang von einem autotrophen zu einem heterotrophen Organismus, auch eine Veränderung ihrer physiologischen Leistungen erfahren müssen, wurde auch der Einfluß der Art der organischen Kohlenstoffquelle auf den Umwandlungsvorgang während der Wärmebehandlung untersucht. Dies war umso notwendiger, als vergleichende Untersuchungen über die Verwertbarkeit von organischen Kohlenstoffverbindungen und deren Auswirkung auf die Stoffwechselablaufe von Euglena gracilis, wobei als Kohlenstoffquellen in der Hauptsache Glucose, Athanol und Natriumacetat angeboten wurden (1,2,3,8,15,17,18,21,22,37,38,41,42,43,45,46), bereits gezeigt haben, daß sowohl beim Wechsel von der autotrophen auf die heterotrophe Ernährungsweise als auch beim Wechsel von einer organischen Kohlenstoffquelle auf eine andere ein stoffwechselphysiologischer Umwandlungsprozeß des Organismus erfolgt. So enthalten z.B. Euglenen, die in einem "Acetatmedium" gewachsen sind, etwa 5o% mehr RNS als Euglenen aus einem "Glucosemedium" (Cook und Heinrich 1965). Deshalb wurden aus dem thermosensiblen Abschnitt A des Zellzyklus entnommene Euglenen unter Zusatz von Glucose oder Athanol oder Natriumacetat unter Beibehaltung der bisherigen Parameter der Warmebehandlung unterworfen. Zum Vergleich wurden "Kontrollkulturen" bei 27°C ebenfalls 15o Std. lang

im Dauerlicht in Anwesenheit der gleichen Kohlenstoffquelle wie bei der Wärmebehandlung kultiviert.Wie aus Abbildung 12 ersichtlich,nahm der Chlorophyllgehalt/ml Algensuspension aller bei 27°C gehaltenen Kulturen zu,während die höhere Temperatur bei einer Anzucht in Glucose- oder Natriumacetethaltigem Medium eine deutliche Hemmung der Chlorophyllsynthese bewirkte.Nur bei einer Kultur mit Äthanol stieg auch bei 35°C der Chlorophyllgehalt/ml Algensuspension an. Die Nachkommen der ausgebleichten Kulturen blieben auch bei anschließender Kultivierung unter Normalbedingungen (27°C) völlig apochlorotisch.

Somit ist der Erfolg der Wärmebehandlung bei dem in den bisherigen Versuchen verwendeten Stamm T von Euglena gracilis von der Art der zugesetzten Kohlenstoffquelle abhängig,womit offensichtlich hier zwei Faktoren,Wärmebehandlung und günstige Kohlenstoffquelle,zur Erzielung der Apochlorose zusammenwirken müssen.Zur Verbesseung der experimentellen Bedingungen ,die ja den Bleichvorgang unbeeinflußt von anderen exogenen Bedingungen als der Temperatur ermöglichen soll, war es daher notwendig,einen Stamm von Euglena gracilis zu finden,bei dem die eben beschriebene Kopplung zwischen der Art der Kohlenstoffquelle bei heterotropher Ernährung und der Thermosensibilität entfällt.Nach der von Pringsheim und Pringsheim (1952) angegebenen Unterteilung der Stämme von Euglena gracilis gehört der bisher verwendete Stamm T in die Gruppe 2 (Euglenen,die bei 34°C bis 35°C ihr Maximum der Kultivierungstemperatur haben und dann auch apo-

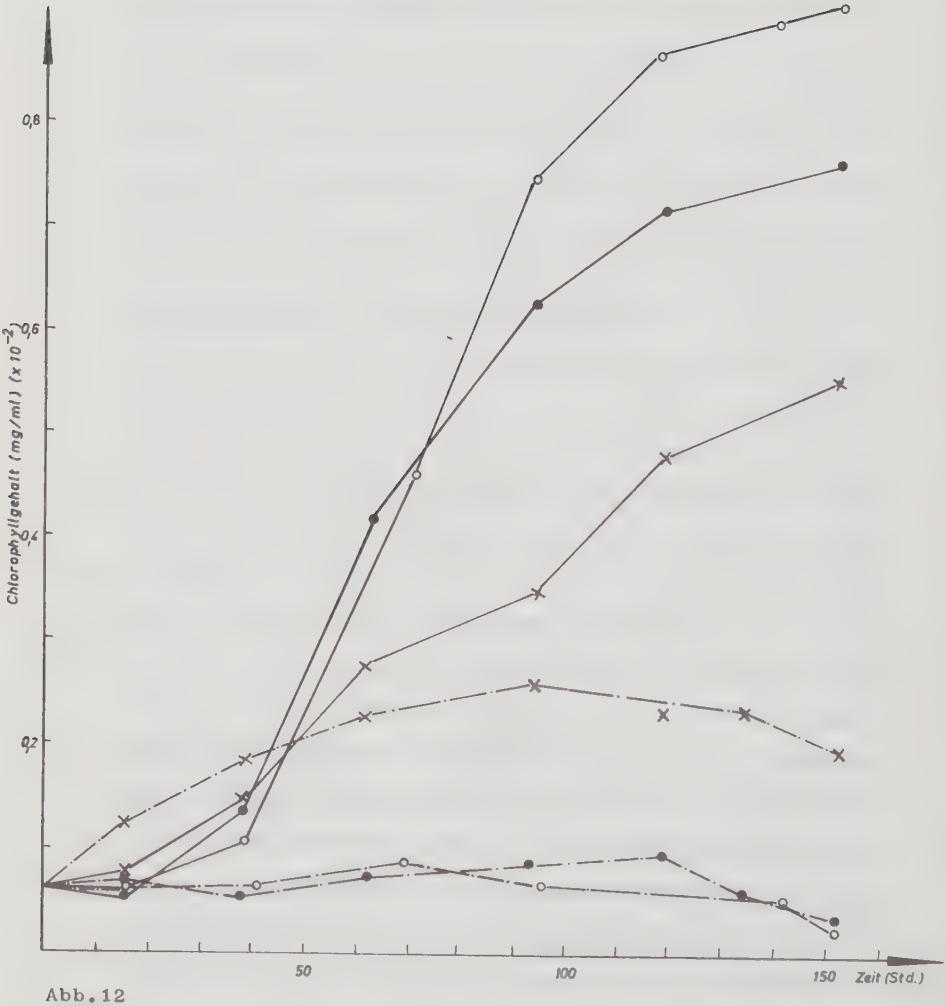

Abb.12

Veränderung des Chlorophyllgehalts von sechs zur 5.LST einer Synchronkultur von Euglena gracilis,Stamm T entnommenen Algenproben während einer Kulturzeit von 15o Std.
Dauerlicht 1o ooo Lux;Zugabe von Glucose • bzw. Natriumacetat o bzw. Äthanol x zu Versuchsbeginn;————Temperatur von 27°C, —·—·—Temperatur von 35°C

chlorotisch werden).Als neue Untersuchungsobjekte wurden daher je ein Stamm aus der Gruppe 1 und 3 auf ihre Thermosensibilität hin geprüft.Es waren dies der Stamm Z aus der Gruppe 1 (Euglenen,die bei 28°C gut kultiviert werden können) und der Stamm V aus der Gruppe 3 (Euglenen,die bei 34°C bis 35°C ihr Maximum der Kultivierungstemperatur haben und nicht apochlorotisch werden).Beide Stämme wurden bei 27°C bzw. bei 35°C im Dauerlicht 15o Std. lang unter Zusatz von entweder Glucose oder Natriumacetat oder Äthanol kultiviert und während dieser Zeit auf ihren Chlorophyllgehalt hin untersucht.Bei beiden Algenstämmen wirkten sich Wärmebehandlung und Art der Kohlenstoffquelle sehr unterschiedlich aus (Abb. 13 und 14).Bei 27°C zeigte keiner der beiden Stämme eine Hemmung der Chlorophyllsynthese durch die heterotrophe Ernährung im Licht.Bei 35°C wurde beim Stamm Z unabhängig von der jeweils den Kulturen angebotenen Kohlenstoffverbindung stets die Chlorophyllsynthese unterbrochen,während der Stamm V stets zwar eine geminderte,aber doch deutliche Chlorophyllsynthese zeigte.Eine Übersicht über die Veränderungen im Chlorophyllgehalt der Euglenen aller drei Stämme bei den unterschiedlichen Kulturbedingungen ermöglichen die in Tabelle 3 angegebenen S_k-Faktoren,die Abbildung 15 als Blockdiagramm zeigt.

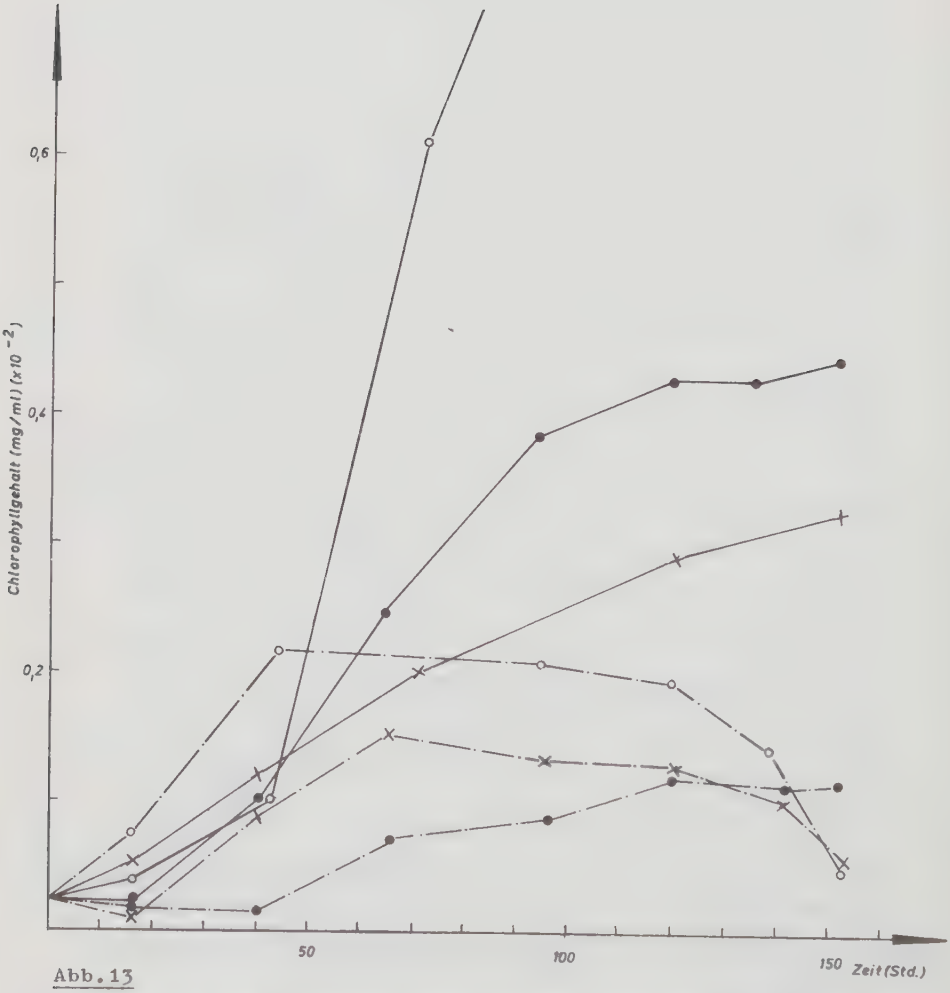

Abb. 13

Veranderung des Chlorophyllgehalts von sechs zur 5.LST einer Synchronkultur von Euglena gracilis, Stamm V entnommenen Algenproben während einer Kulturzeit von 15o Std.
Dauerlicht 1o ooo Lux; Zugabe von Glucose ● bzw. Natriumacetat o bzw. Äthanol x zu Versuchsbeginn; ———— Temperatur von 27°C, —·—·— Temperatur von 35°C

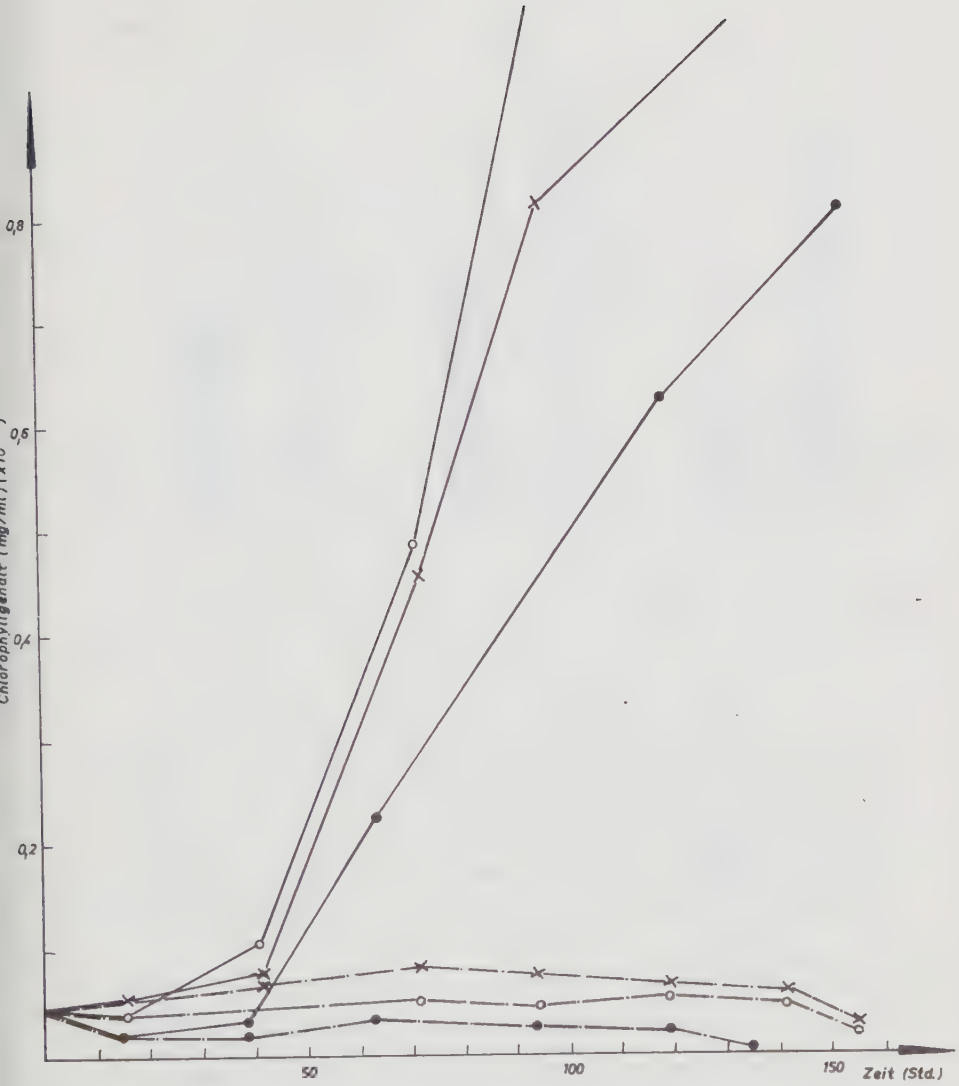

Abb.14

Veränderung des Chlorophyllgehalts von sechs zur 5.LST einer Synchronkultur von Euglena gracilis, Stamm Z entnommenen Algenproben während einer Kulturzeit von 150 Std.
Dauerlicht 10 000 Lux; Zugabe von Glucose • bzw. Natriumacetat o bzw. Äthanol x zu Versuchsbeginn; ——— Temperatur von 27°C, —·—·— Temperatur von 35°C

Tabelle 3:

S_k-Werte für die Stämme T,V und Z von Euglena gracilis nach einer Kulturzeit von 15o Std im Dauerlicht bei 27°C bzw. 35°C unter Zugabe von Glucose,Natriumacetat oder Äthanol als Kohlenstoffquelle.Das Ausgangsmaterial für die Kulturen wurde jeweils einer Synchronkultur in der 5.LST entnommen.

	Glucose		Na-Acetat		Äthanol	
	27°C	35°C	27°C	35°C	27°C	35°C
T	+78,3	- 2,7	+ 95,o	- 3,9	+ 54,4	+15,6
V	+112,8	+25,3	+261,3	+ 9,3	+81,9	+12,o
Z	+1o1,3	- 6,6	+16o,o	- 3,3	+136,6	- 2,7

Damit liegen die experimentellen Bedingungen zur quantitativen Umwandlung einer ganzen Population grüner Euglena gracilis in einheitlich gebleichte Zellen vor,und es wurde zur Analyse dieses Umwandlungsprozesses bei allen folgenden Versuchen nur noch der Stamm Z von Euglena gracilis benutzt.

Der interessanten Frage,warum bei Stamm T die Kohlenstoffquelle den Bleichvorgang beeinflußt,bzw. warum beim Stamm V keine permanente Apochlorose erzeugt werden kann,wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen.

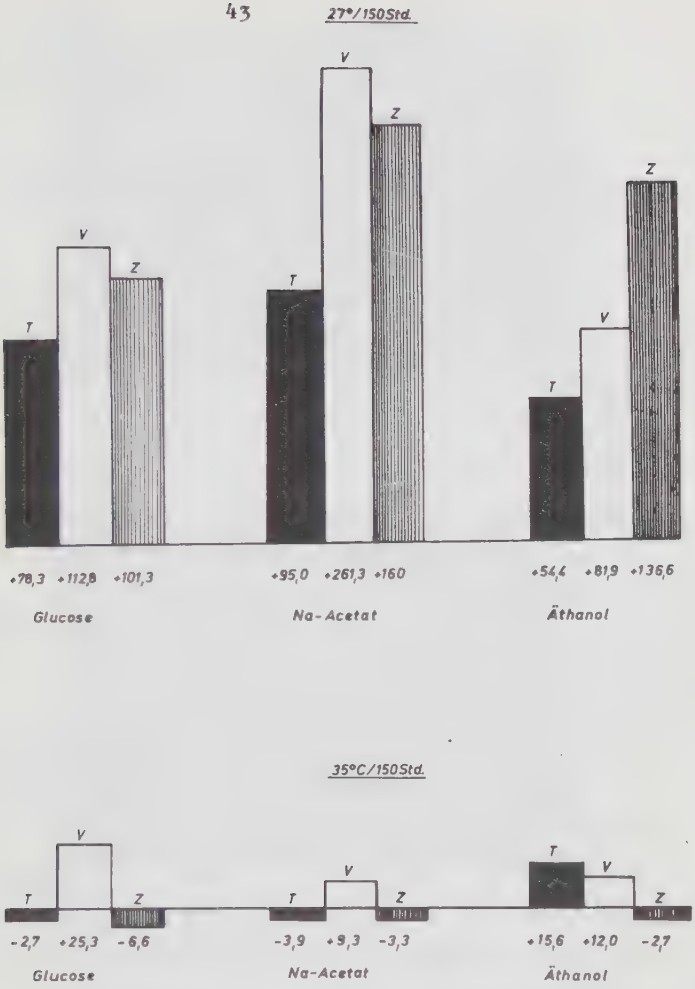

Abb.15

Sensibilität von Euglena gracilis

Stamm T

Stamm V

Stamm Z

bei heterotropher Ernährung durch Glucose oder Natrium-acetat oder Äthanol bei 27°C bzw. 35°C

Dargestellt durch S_k-Faktoren; Dauerlicht 10000 Lux; Kultivierungszeit 150Std.

3.3. Durch Einwirkung höherer Temperatur bewirkte cytologische Veränderungen bei Euglena gracilis

Weiße Zellen von Euglena gracilis sind kleiner als grüne Zellen. In der Beweglichkeit und im Bewegungsablauf liegen keine wesentlichen Unterschiede zwischen diesen beiden Zelltypen vor. Die grünen Euglenen reagieren lediglich auf starke Lichteinstrahlung mit stärkeren metabolischen Gestaltsveränderungen. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen normal grüne bzw. durch Einwirkung höherer Temperatur gebleichte Euglenen. Auf der Abbildung 18 sind eine Massenkultur von normal grünen und eine von gebleichten Zellen zu sehen.

Ein Vergleich elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Schnittpräparaten beider Zelltypen (Abb. 19 und 2o) ergibt folgendes Bild: Bei grünen Euglenen durchziehen gut ausgebildete Chloroplasten die Zellen. Diese fehlen in den hitzegebleichten Organismen. In den hitzegebleichten Zellen sind außerdem die Mitochondrien größer als in den grünen Euglenen.

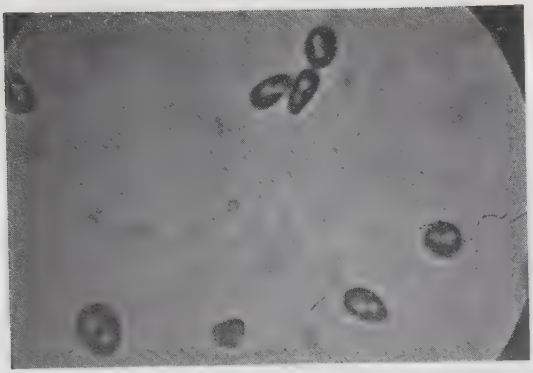

Abbildung 16

Abbildung 17

Abbildung 18

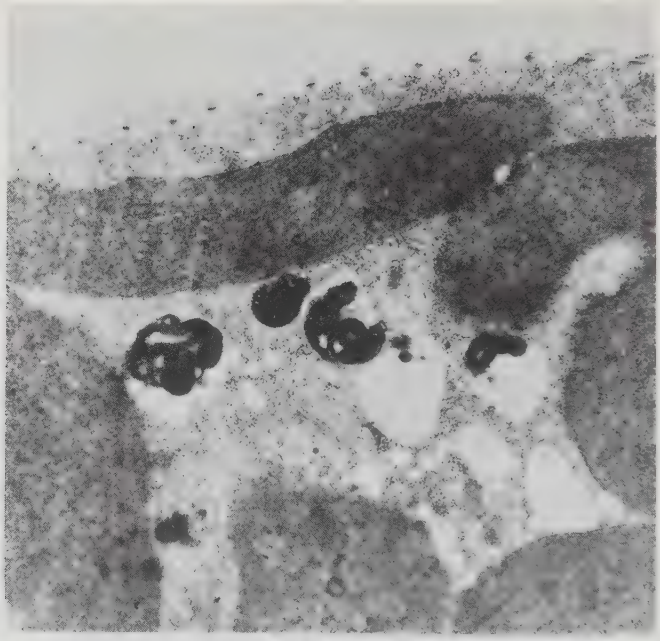

Abb.19 Ausschnitt aus einer autotroph kultivierten Zelle von Euglena gracilis,Stamm Z.Entnommen zur 6.LST der Synchronkultur,Kultivierungstemperatur 27°C,Vergrößerung 2oooo : 1

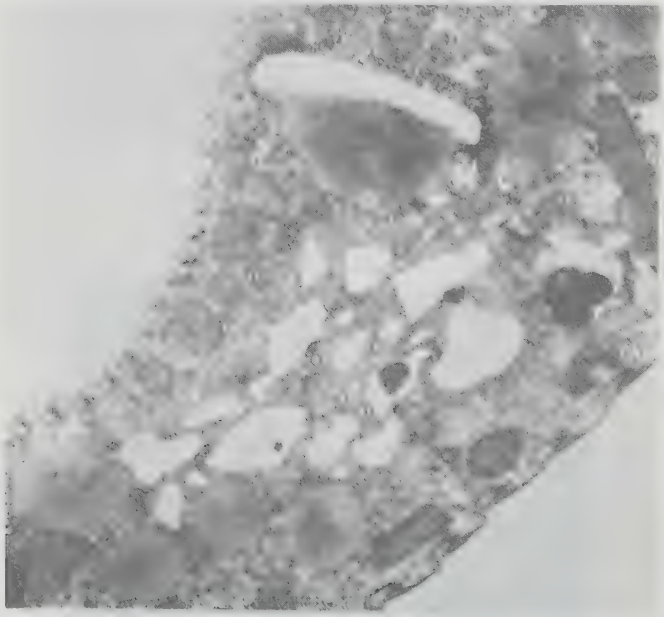

Abb.2o Ausschnitt aus einer Zelle von Euglena gracilis, Stamm Z nach einer 12o stündigen Wärmebehandlung von 35°C und anschließender Weiterkultivierung (8oTage) bei 27°C. Vergrößerung 2oooo : 1

3.4. Der Einfluß externer Faktoren auf das "Realisationssystem" der genetischen Information im Chloroplasten

Nachdem somit nun die experimentellen Bedingungen zur Erzeugung der permenenten Apochlorose bei Euglena gracilis festliegen,ist zu klären,auf welche Weise das Zusammenwirken von Licht und höherer Temperatur diese permanente Apochlorose herbeiführt.In erster Linie ist dabei an eine Beeinflussung der Mechanismen genetischer Informationsübertragung zu denken.So bewirkt z.B. Licht,wie schon Ingle (1968) nachweisen konnte,in Radieschen-Kotyledonen eine temporar gesteigerte RNS-Synthese,oder induziert Licht nach Wanka (1962,1968,1969) bei Chlorella pyrenoidosa die nukleäre DNS-Synthese.Es liegt daher nahe,daß das Zusammenwirken von Licht und höherer Temperatur bei Euglena gracilis ebenfalls über eine Veränderung im genetischen "Realisationssystem"(DNS→RNS→Protein) zur Apochlorose führt.Da experimentell erzeugte apoplastidische Euglenen mit Ausnahme des Plastidenverlustes außerdem keine weiteren Veränderungen im Vergleich zu den grünen Euglenen aufweisen, müssen beide Faktoren demnach vorzugsweise auf die (semi)autonomen Chloroplasten wirken.Zur Analyse des Mechanismus des Bleichvorgangs wurde daher im weiteren das Verhalten der plastidären DNS-,der plastidären RNS- und der +Plastidenprotein-Synthese während der Wärmebehandlung überprüft.

+Unter Plastidenproteinen verstehe ich die Gesamtheit der für Struktur und Funktion des Chloroplasten notwendigen Proteine ohne Berücksichtigung ihrer Herkunft.

3.4.1.Der Einfluß von Licht+höherer Temperatur auf die Synthese plastidärer DNS

Wie in Kapitel 3.3. gezeigt,sind in hitzegebleichten Euglenen keine Chloroplasten mehr vorhanden.Nach Uzzo und Lyman (1971) fehlt ihnen daher auch die plastidäre DNS. Es besteht daher Grund zu der Annahme,daß die höhere Kultivierungstemperatur direkt oder indirekt die plastidäre DNS-Synthese beeinflußt.

In der autotroph kultivierten Euglenazelle ist etwa 95-97% der DNS nukleären, 1,5-3,5% plastidären und etwa 1,5% mitochondrialen Ursprungs.Um das Verhalten der plastidären DNS im Zellzyklus von Euglena gracilis während der thermosensiblen Phasen untersuchen zu können,mußte daher die plastidäre DNS wegen ihrer geringen Konzentration in der Zelle extra angereichert werden.Dies gelang mittels einer modifizierten Form der Chloroplastenisolierung nach Brawermann (1963) und Jagendorf (1955).Als "Chloroplastenfraktion" wurde dabei dem Saccharose-Glycerin-Gradienten nach dem Zentrifugieren die grün gefärbte Bande mit hohem Chlorophyll- und Proteingehalt entnommen (Abb.21).Zur Auftrennung der aus der Chloroplastenfraktion zu extrahierenden DNS in ihre plastidären und die möglicherweise vorhandenen nuklearen und mitochondrialen DNS-Anteile wurde die aus der Chloroplastenfraktion gewonnene DNS an einer MAK-Säule mit einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten eluiert,da aus den Untersuchungen von Chiang und Sueoka (1967),Manning Wolstenholme,Ryan,Hunter und Richards (1971),Richards und Manning(1971) und Uzzo u. Lyman(1971)bekannt ist,daß sich die

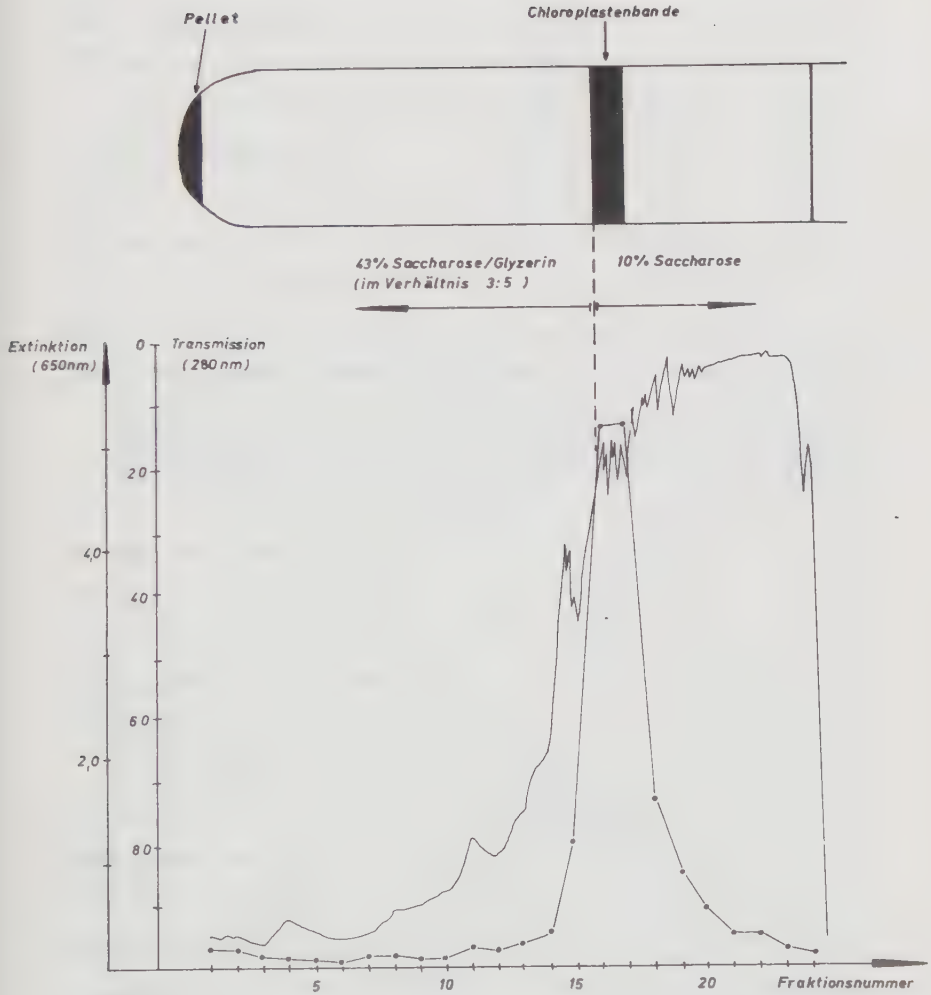

Abb.21

Extinktion bei 650nm und Transmission bei 280nm des auf einem Saccharose-Glycerin-Gradienten aufgetrennten Zellhomogenats von Euglena gracilis;das Pellet wurde nicht berücksichtigt.

——•——•—— Extinktion bei 650 nm

———————— Transmission bei 280 nm

drei DNS-Arten der Zelle voneinander in ihren Dichten unterscheiden.Für die Kern-DNS von Euglena gracilis wird eine Dichte von 1,7o9 g/cm^3,für die Chloroplasten-DNS eine Dichte von 1,686 g/cm^3 und für die Mitochondrien-DNS eine Dichte von 1,691 g/cm^3 angegeben (Schiff 1974).Auf Grund dieser unterschiedlichen Dichten wird daher die nukleäre DNS an der MAK-Säule vor der mitochondrialen,und diese vor der plastidären DNS eluiert.Die Transmissionkurve der eluierten DNS ist eine zweigipflige Maximumskurve (Abb.22a). Im Vergleich hierzu weist die Transmissionskurve der aus ganzen Zellen extrahierten DNS (im Folgenden als "Gesamt--DNS" bezeichnet) nur ein eingipfliges Maximum mit steilem Anstieg und flachem Abfall auf.Setzt man dieser "Gesamt--DNS" die gleiche Menge DNS der "Chloroplastenfraktion" zu, so folgt auf den ohne Zusatz schon vorhandenen Gipfel ein zweiter Gipfel im Bereich des langsamen Abfalls (Abb.22b). Demnach handelt es sich in den Abb.22 a und 22b beim jeweils ersten Maximum um Kern-DNS und der darauffolgende zweite Gipfel müßte dann plastidäre DNS sein,wenn man unterstellt, daß die mitochondriale DNS quantitativ nicht in Erscheinung tritt.Zum weiteren genaueren Nachweis der Reinheit der aus der Chloroplastenfraktion des Saccharose-Glycerin-Gradienten extrahierten plastidären DNS-Fraktion wurden sowohl die Desoxyribonukleinsäure der Chloroplastenfraktion als auch - zum Vergleich- die Gesamt-DNS mit Hilfe eines CsCl-Gradienten (Manning et al. 1971) aufgetrennt.Wie in Abbildung 23 a und 23 b ersichtlich,erhält man bei der Auftrennung

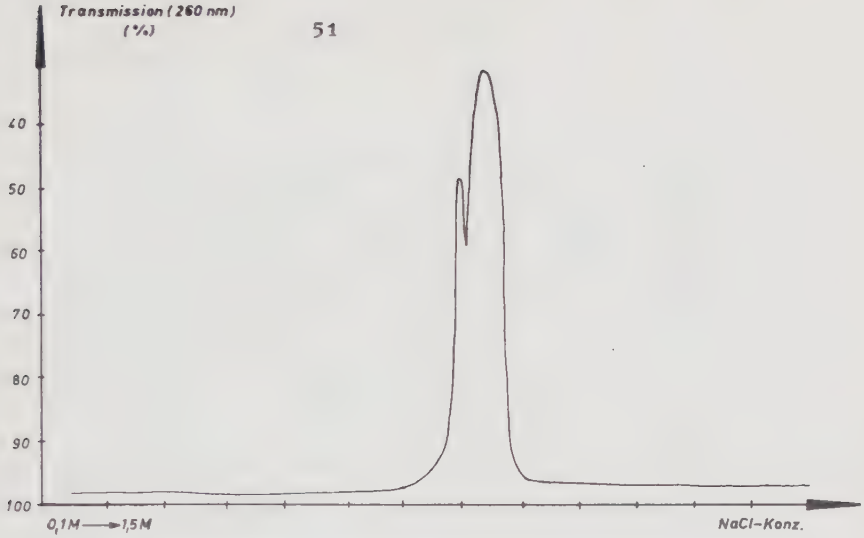

Abb. 22a 260nm-Transmissionskurve der an einer MAK-Säule eluierten DNS aus der Chloroplastenfraktion des Saccharosegradienten (Kontinuierlicher NaCl-Gradient, o,1 -1,5M)

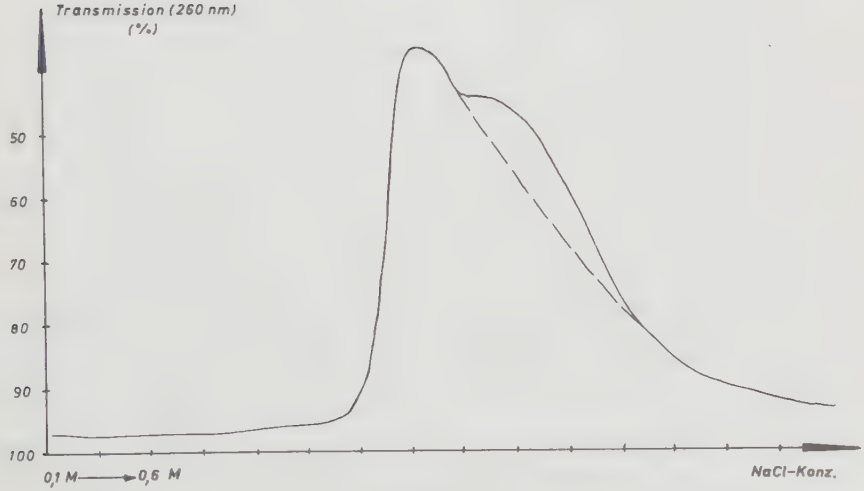

Abb. 22b 260nm-Transmissionskurve der an einer MAK-Säule eluierten DNS aus der gesamten Zelle unter Zusatz von DNS aus der Chloroplastenfraktion des Saccharosegradienten (----- ohne Zusatz)(Kontinuierlicher NaCl-Gradient o,1 - o,6 M)

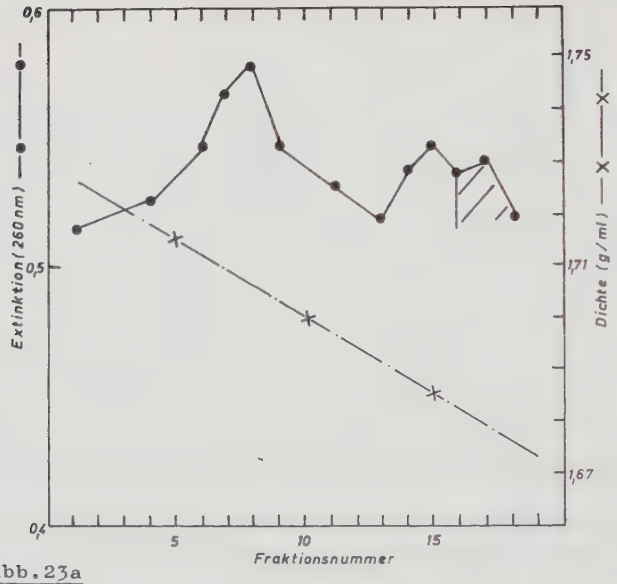

Abb.23a

Extinktion eines in Fraktionen von je 15 Tropfen aufgetrennten CsCl-Gradienten nach 5o Std. bei 15o ooo g, der mit der DNS ganzer Zellen beschickt wurde

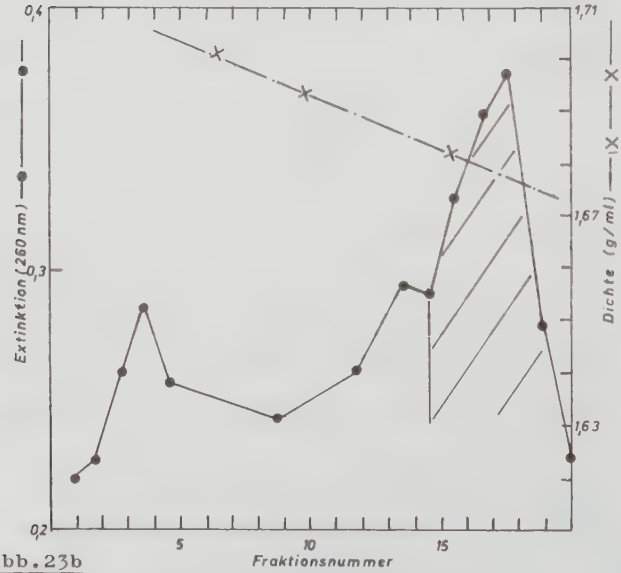

Abb.23b

Extinktion eines in Fraktionen von je 15 Tropfen aufgetrennten CsCl-Gradienten nach 5o Std. bei 15o ooo g, der mit der DNS der Chloroplastenfraktion des Saccharosegradienten beschickt wurde

der Gesamt-DNS drei Extinktionsmaxima,deren Dichte -ver=glichen mit den aus der Literatur bekannten Angaben - auf ihre Zugehörigkeit zu verschiedenen Zellbereichen hinwei=sen.Demnach ist das Maximum der Fraktion 8 (Abb.23a) der DNS des Zellkerns,das Maximum der Fraktion 15 der DNS der Mitochondrien und das Maximum der Fraktion 17 der DNS der Chloroplasten zuzuordnen.Alle drei Maxima treten auch bei der Auftrennung der DNS der Chloroplastenfraktion auf (Abb.23b),jedoch ist hier die plastidäre DNS um ein Viel=faches gegenüber der nukleären und mitochondrialen DNS angereichert.Damit ist der oben beschriebene Saccharose--Glycerin-Gradient zur Isolierung der Chloroplasten von Euglena gracilis und zur anschließenden Extraktion plasti=därer DNS verwendbar.

Die Bestimmung der plastidären DNS-Synthese während des Zellzyklus von Euglena gracilis erfolgte durch Inkubation mit ^{3}H-Adenin.Anschließend wurden die Chloroplasten auf die oben beschriebene Weise isoliert und die plastidäre DNS extrahiert.Der Einbau von ^{3}H-Adenin in die plastidäre DNS (bezogen auf den Chlorophyllgehalt) während des Zell=zyklus ist in Abbildung 24 wiedergegeben.Es treten deut=lich zwei Abschnitte plastidärer DNS-Synthese (I und II) hervor,und zwar I in der 2.LST und II in der 9.LST.Ein Vergleich mit der Abbildung 5 zeigt,daß diese beiden Maxi=ma der Synthese plastidärer DNS den nachgewiesenen thermo=

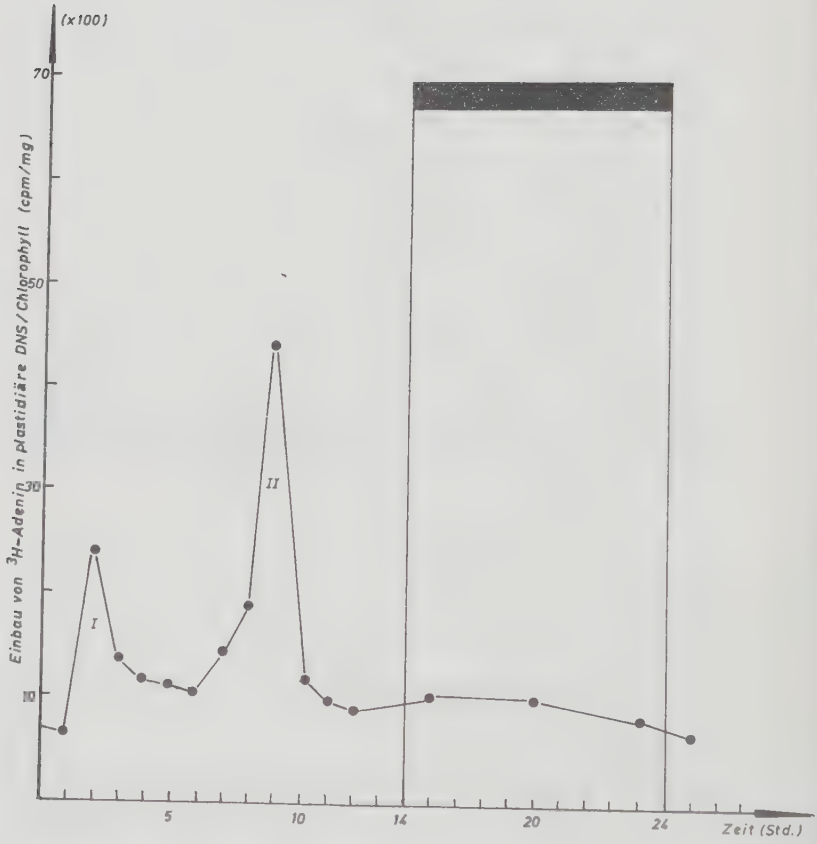

Abb.24

Einbau von ^{3}H-Adenin in die plastidäre DNS von Euglena gracilis,Stamm Z während des Zellzyklus

sensiblen Abschnitten A und B im Zellzyklus von Euglena gracilis vorausgehen. Damit entfällt die Möglichkeit einer direkten Hemmung der plastidären DNS-Synthese durch die höhere Temperatur. Aber es ist nicht nur an eine direkte Einflußnahme der Temperatur auf die plastidäre DNS zum Zeitpunkt ihrer Synthese zu denken, sondern auch an die Möglichkeit, daß durch den Wechsel von 27°C auf 35°C im thermosensiblen Abschnitt A (3.-8.LST) die höhere Temperatur die Initiierung der plastidären DNS-Synthese zur 9.LST negativ beeinflußt. Abbildung 25 verdeutlicht, daß die Intensität der plastidären DNS-Synthese im Abschnitt II jedoch durch Wärmebehandlung nicht erniedrigt, sondern im Gegenteil sogar etwas gesteigert (+3o%) wird. Allerdings verschiebt sich das Synthesemaximum zeitlich um 1 Std. von der 9.LST auf die 1o.LST. Damit kann auch die oben angeführte Möglichkeit der Einflußnahme der höheren Temperatur auf die DNS-Synthese, daß nämlich die plastidäre DNS-Synthese im Abschnitt II durch die höhere Kultivierungstemperatur (nach einer Einwirkungszeit von 5 Std.) unmittelbar gehemmt wird, als Ursache des Ausbleichens ausgeschlossen werden.

Da die Bleichbehandlung nur bei Dauerlicht Erfolg hat, ist als nächstes die Frage nach der Abhängigkeit der plastidären DNS-Synthese vom Licht zu klären. Hierzu wurden bei 27°C kultivierte Synchronkulturen von Euglena

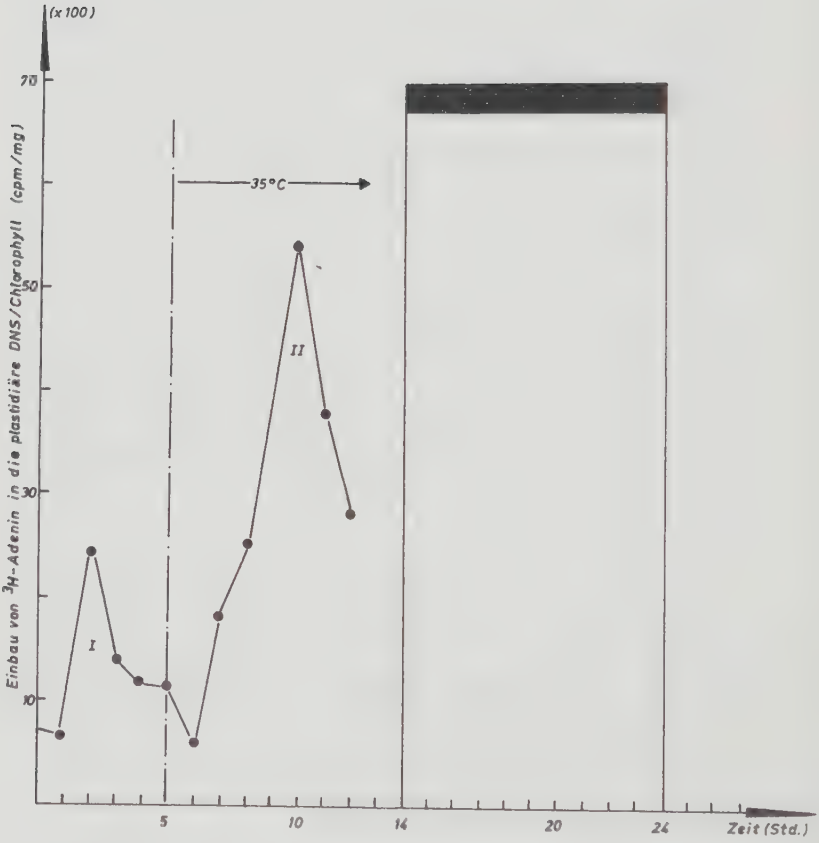

Abb.25

Einbau von ^{3}H-Adenin in die plastidäre DNS einer Synchronkultur von Euglena gracilis, Stamm Z, deren Kultivierungstemperatur von der 5.LST an von 27°C auf 35°C erhöht wurde

gracilis während der Lichtzeit zu bestimmten Zeiten (siehe Abbildung 26) verdunkelt.Es ergab sich,daß die plastidäre DNS-Synthese während des Abschnittes I nicht nur im Licht,sondern auch im Dunkeln abläuft,allerdings mit einer um 5o% geminderten Leistung (Abb.26b).Die plastidäre DNS-Synthese während des Abschnittes II kann dagegen durch Dunkelheit völlig verhindert werden (Abb.26b).Sie ist auch dann unterbunden,wenn die Algen= kultur erst von der 4.Std. der eigentlichen Lichtzeit an verdunkelt wird (Abb.26e).Verdunkelung von der o.LST bis zur 4.LST bzw. von der 1.LST bis zur 4.LST beein= flußt die plastidäre DNS-Synthese des Abschnittes II da= gegen überhaupt nicht (Abb.26c und 26d).Liegt Dunkelheit erst zur 7. oder 8.LST der eigentlichen Lichtzeit vor, so ist die plastidäre DNS-Synthese des Abschnittes II immerhin noch um 5o% gemindert (Abb. 26f und 26g).

Diese Befunde beweisen,daß

1.sich die beiden Abschnitte der Synthese plastidärer DNS im Generationszyklus von Euglena gracilis durch ihre Lichtabhängigkeit voneinander unterscheiden,

2.eine Steuerung der DNS-Synthese im Abschnitt II durch die plastidäre DNS-Synthese des Abschnittes I nicht besteht und

3.die Intensität der Synthese plastidärer DNS während des Abschnittes II von der Syntheseintensität im Abschnitt I unabhängig ist.

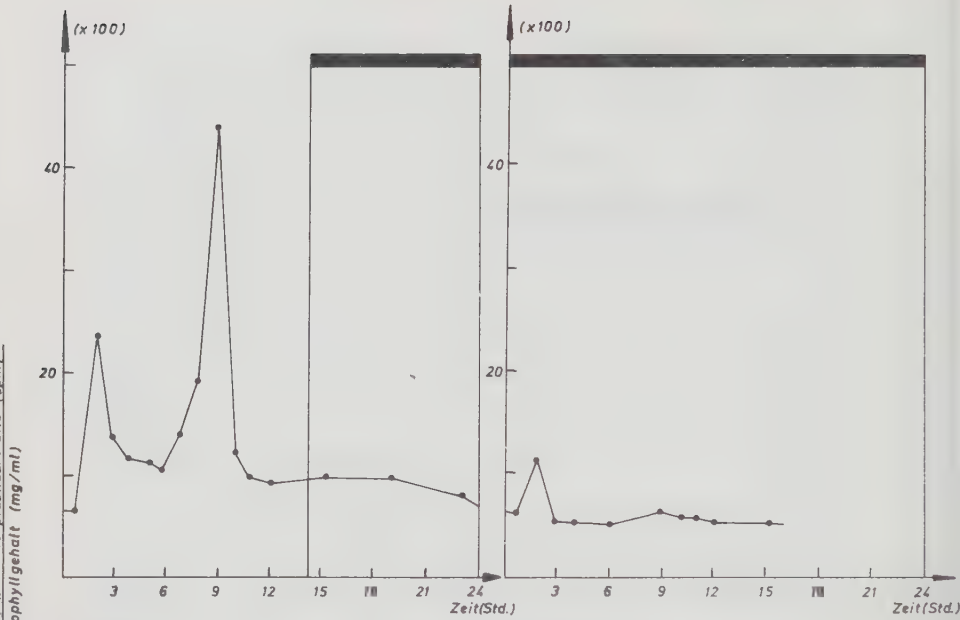

Abb.26a

Abb.26b

Einbau von ^{3}H-Adenin in die plastidäre DNS (cpm)
Chlorophyllgehalt (mg/ml)

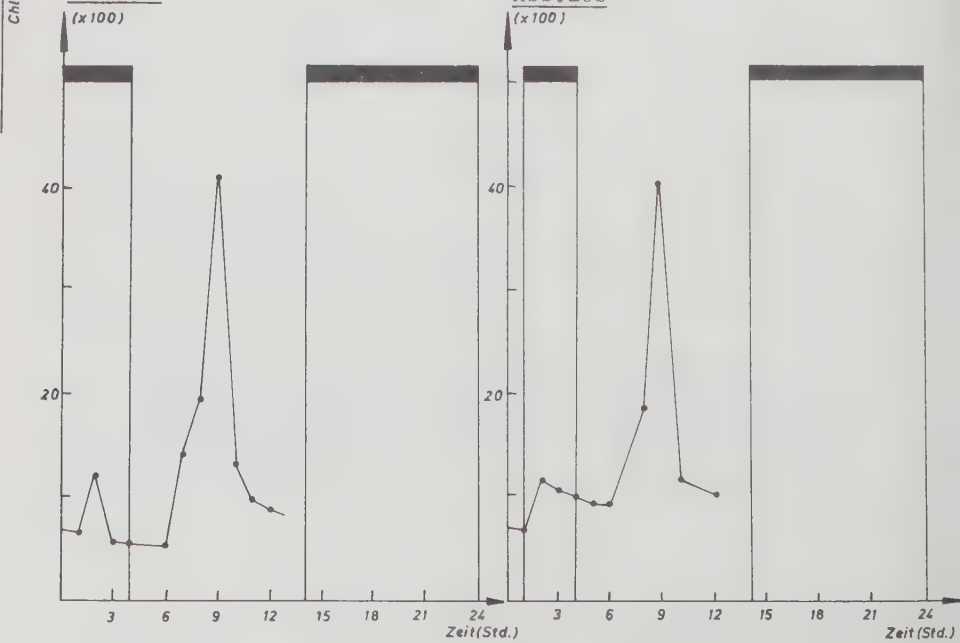

Abb.26c

Abb.26d

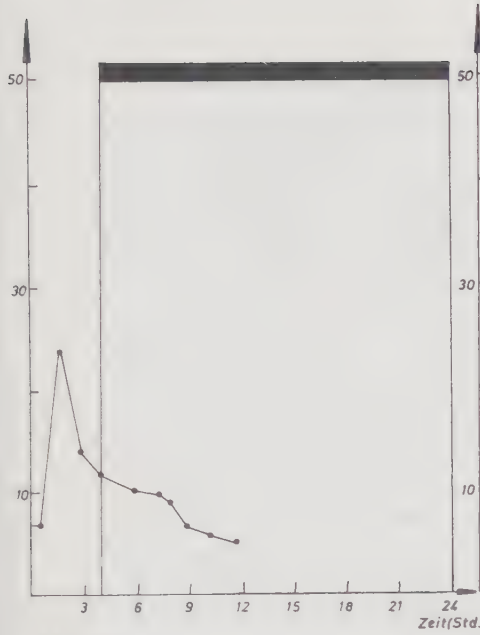

Abb.26e

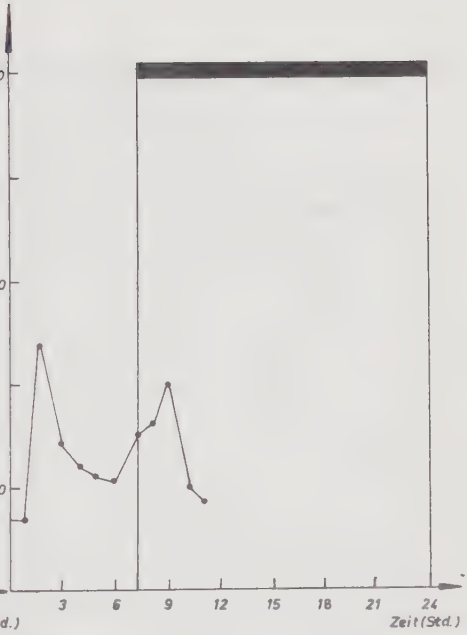

Abb.26f

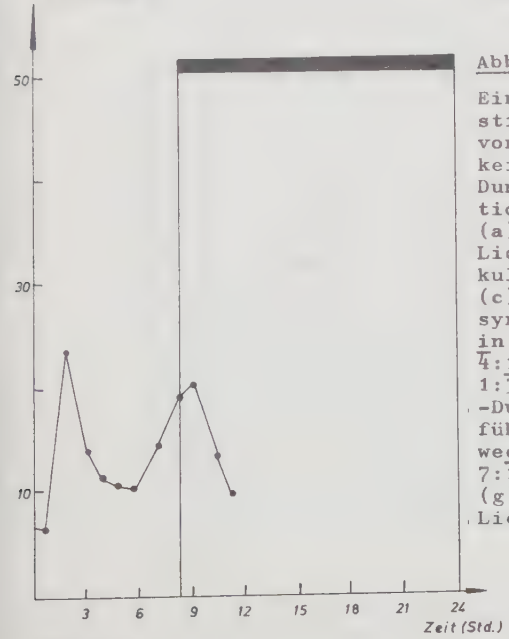

Abb.26g

Abb.26a-g

Einbau von ^{3}H-Adenin in die plastidäre DNS einer Synchronkultur von Euglena gracilis in Abhängigkeit von der Dauer der Licht- u. Dunkelzeit während eines Generationszyklus.
(a)Synchronkultur 14:$\overline{1o}$ Std. Licht-Dunkel-Wechsel (b)Synchronkultur in Dauerdunkel überführt (c)Im Licht-Dunkel-Wechsel 14:$\overline{1o}$Std. synchronisierte Kultur überführt in Dunkel-Licht-Dunkel-Wechsel $\overline{4}$:1o:$\overline{14}$ (d) Wie (c) überführt in 1:$\overline{3}$:1o:$\overline{14}$ Std. Licht-Dunkel-Licht--Dunkel-Wechsel (e)Wie (c) überführt in 4:$\overline{2o}$ Std. Licht-Dunkelwechsel (f) Wie (c) überführt in 7:$\overline{17}$ Std. Licht-Dunkel-Wechsel (g) Wie (c) überführt in 8:$\overline{16}$Std. Licht-Dunkel-Wechsel

Ergebnis: Die soeben vorgestellten Befunde zur Wirkung von Licht + höherer Temperatur auf die Synthese plastidärer DNS zeigen,daß eine Temperatur- oder Lichtabhängige Beeinflussung der plastidären DNS-Synthese nicht der zur Apochlorose führende Primäreffekt der Wärmebehandlung sein kann.

3.4.2. Einfluß der höheren Temperatur auf die Synthese der Plastidenproteine

Wie in Kapitel 3.4.1. ausgeführt, liegen die thermosensiblen Abschnitte A und B im Entwicklungszyklus von Euglena gracilis jeweils hinter den Bereichen plastidärer DNS-Synthese. Damit wären die Euglenen gerade dann thermosensibel, wenn nach unseren bisherigen Kenntnissen über die zeitliche Abfolge des Gesamtvorgangs der Realisation der genetischen Information im Anschluß an die abgeschlossene plastidäre DNS-Synthese im Licht die Transkription und die Translation stattfinden. Bei der methodischen Erfassung der Einflußnahme der höheren Temperatur auf die Transkription erwies sich die Wahl der Bezugsgröße als schwierig. Als solche kommt der Proteingehalt in Frage. Da jedoch, wie oben erläutert, eine Einflußnahme der Temperatur auf die Translation nicht auszuschließen ist, mußte zuerst diese Frage überprüft werden, wobei sich als Bezugsgrößen der Chlorophyllgehalt und der Gehalt an plastidärer DNS anbietet, über deren Veränderung im Laufe des Bleichvorgangs die analytischen Daten in dieser Arbeit bereits vorgelegt wurden. Daher wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob die Proteinbiosynthese durch die Temperatur während der thermosensiblen Abschnitte beeinflußt wird. Zu ihrer Beantwortung wurde zunächst der Gehalt an Plastidenproteinen während des Entwicklungszyklus von Euglena gracilis (nach der Mikrokjeldahlmethode) bestimmt. Als Bezugsgröße diente

der Gehalt an plastidärer DNS,bestimmt nach der Methode von Ruppel (1962).Die Wahl einer Bezugsgröße war unumgänglich,da aus methodischen Grünen mit variablen Plastidenmengen und damit unterschiedlichen Proteinmengen gearbeitet werden mußte.

Aus dem Anstieg oder Abfall des Wertes des auf diese Weise ermittelten Quotienten Plastidenproteine/plastidäre DNS - wobei die Syntheseabschnitte der plastidären DNS bekannt sind (Abb.24) - lassen sich die Syntheseabschnitte der Plastidenproteine während des Zellzyklus von Euglena gracilis ablesen (Abb.27):Ein Anstieg des Quotientenwertes bedeutet Proteinsynthese,ein Abfall eine Synthese plastidärer DNS.Ein erster Abschnitt der Plastidenproteinsynthese liegt zwischen der 2. und der 6.LST,ein weiterer zwischen der 1o.LST und der 3.DST.Der zusätzlich in der Abbildung eingetragene Verlauf der plastidären DNS-Synthese zeigt,daß im ersten Syntheseabschnitt in der 2.LST auch plastidäre DNS synthetisiert wird und daß der zweite Syntheseabschnitt der Proteine unmittelbar auf die plastidare DNS-Synthese zur 9.LST folgt.Das Absinken des Quotienten im Zeitabschnitt von der 6.LST bis zur 1o.LST geht zurück auf die plastidare DNS-Synthese bei gleichzeitigem Absinken der Intensität der Plastidenproteinsynthese.

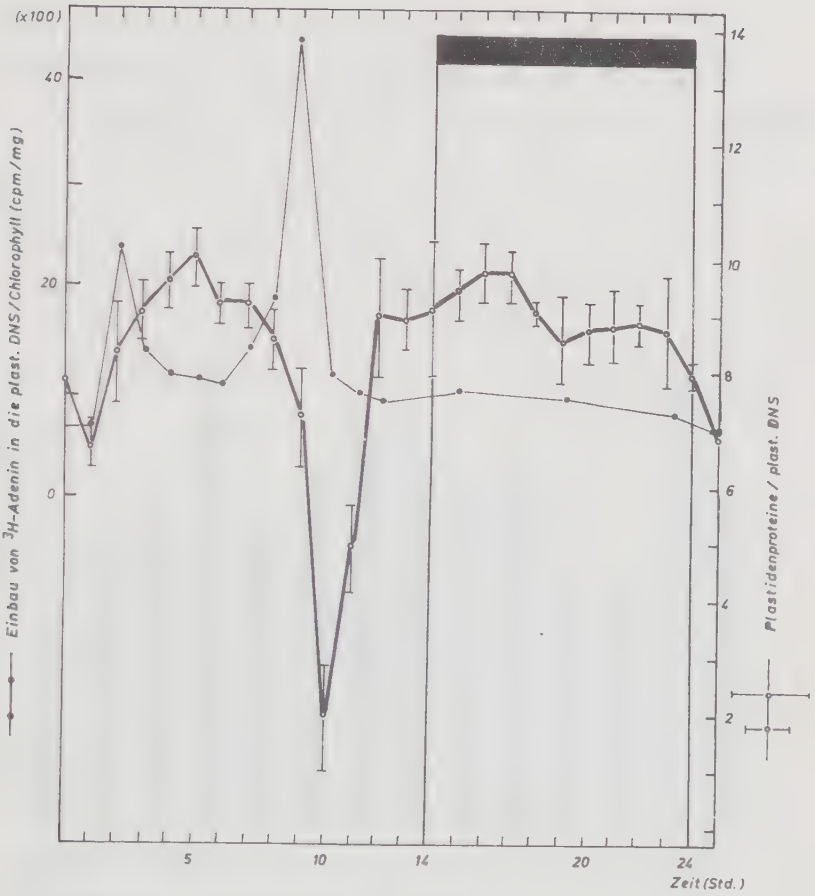

Abb.27

Quotient Plastidenproteine/plastidäre DNS im Laufe des Zellzyklus von Euglena gracilis bei 27°C
Zum Vergleich wurde ebenfalls die plastidäre DNS-Synthese während des Zellzyklus angegeben.

Bei der bisherigen Bestimmung der Veränderungen im Proteingehalt der Chloroplasten wurden stets zusammen mit den neusynthetisierten auch die bereits vorhandenen Plastidenproteine erfaßt.Zur Analyse des Temperatureinflusses auf die Biosynthese von Plastidenproteinen muß jedoch ihre Neusynthese während der Lichtzeit des Zellzyklus quantitativ bestimmt werden.Deshalb wurden zu verschiedenen Zeiten des Zellzyklus entnommene Proben von Euglena gracilis 6o Min. lang mit ^{14}C-Leucin inkubiert, ihre Chloroplasten anschließend isoliert und der Einbau von ^{14}C-Leucin in die Plastidenproteine gemessen.Dabei ergab sich ein diskontinuierlicher Verlauf der Plastidenproteinsynthese während der Lichtzeit des Zellzyklus: Maxima traten zur 4.,7.,1o. und 13.LST auf (Abb.28).Sie stimmen mit den durch Bestimmung des Protein/DNS-Quotienten ermittelten Abschnitten der Plastidenproteinsynthese überein,deren Ablauf während der Lichtzeit des Zellzyklus auf diese Weise durch zwei voneinander unabhängige Methoden nachgewiesen werden konnte.

Es ist möglich,daß diese Synthesemaxima der Plastidenproteine entweder mit bestimmten Entwicklungsstadien der Chloroplasten (z.B. Größenzunahme und Ausgestaltung der Membranen) oder mit der Veränderung ihrer Zahl in der Zelle korrelieren.Daher wurde die Anzahl der Chloroplasten/Zelle während des Zellzyklus mit Hilfe des Fluoreszenz=

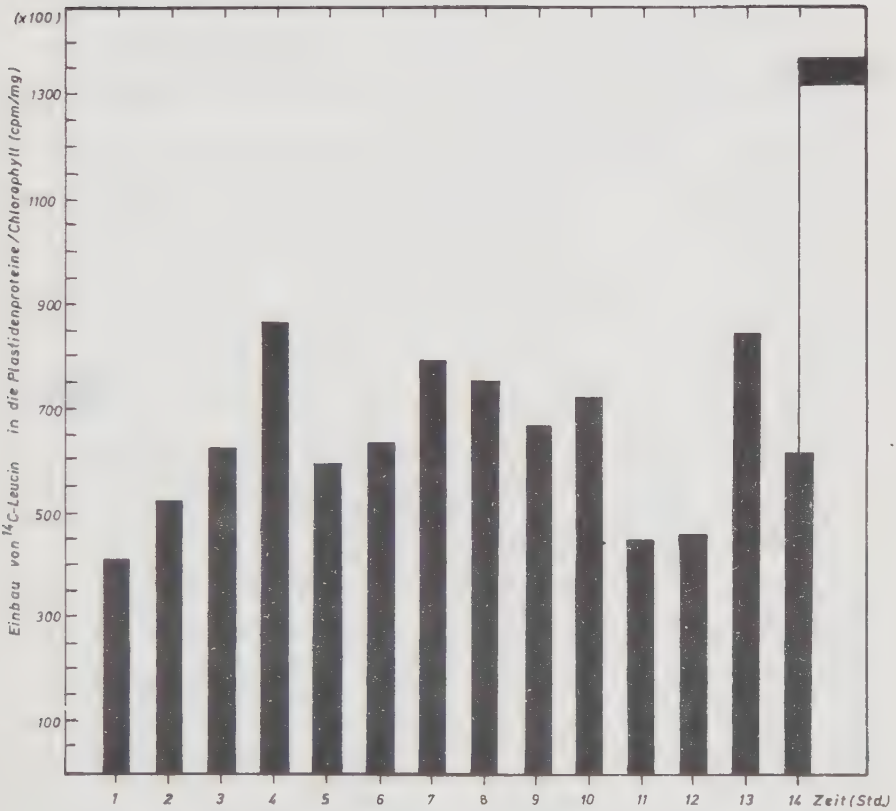

Abb.28

Synthese von Plastidenproteinen (Einbau von ^{14}C-Leucin) während der Lichtzeit des Zellzyklus einer Synchronkultur von Euglena gracilis (27°C)

mikroskops bestimmt,gemittelt aus der Anzahl der Chloro= plasten von jeweils 5o Zellen.Abbildung 29 macht deutlich, daß die Zahl der Chloroplasten/Zelle ungeachtet einer Ab= weichung von ± 15% während der Lichtzeit des Zellzyklus konstant bleibt.Damit können die neusynthetisierten Plasti= denproteine nicht für Teilungsvorgänge der Chloroplasten dienen,sondern zu den mit dem "Heranwachsen" der Chloro= plasten verbundenen Prozessen.

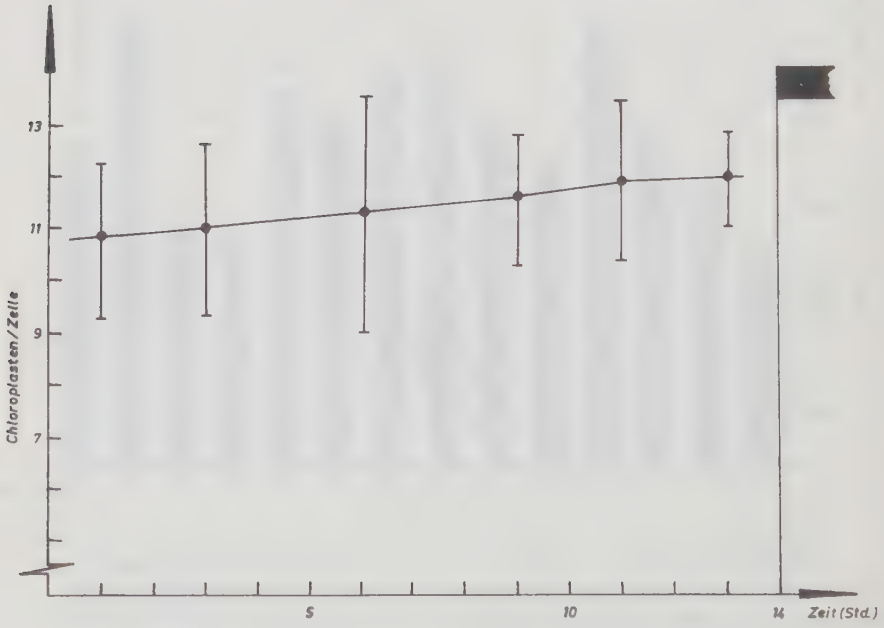

Abb.29

Zahl der Chloroplasten/Zelle während der Lichtzeit des Zellzyklus von Euglena gracilis,Stamm Z (bei 27°C;9ooo Lux; 14:$\overline{1o}$)

Nachdem somit die Zeitabschnitte der Synthese der Plastidenproteine bei einer Anzuchttemperatur von 27°C ermittelt worden waren,wurde der Einfluß einer Temperaturerhöhung auf 35°C auf die Proteinsynthese geprüft.Es zeigte sich (Abb.3o),daß die Erhöhung der Temperatur von 27°C auf 35°C zu einer Senkung der Synthese von Plastidenproteinen um durchschnittlich 6o% führt.

Die Plastidenproteine sind zum Teil im Plastom codiert und werden im Chloroplasten synthetisiert (plastidäre Proteinsynthese),zum Teil ist ihre genetische Information im Genom festgelegt und ihre Synthese findet im Cytoplasma statt (nukleäre Proteinsynthese)(Freyssinet,1974).Zur Aufklärung der Temperaturwirkung ist es daher notwendig zu wissen,ob die Temperatur von 35°C im Licht auf beide Synthesen in gleicher Weise oder mehr selektiv auf die eine oder andere einwirkt.Zuvor mußte jedoch der quantitative Anteil beider Synthesemöglichkeiten an der Gesamtsynthese ermittelt werden.Methodisch werden beide Synthesen durch den Einbau von ^{14}C-Leucin erfaßt und können selektiv durch Anwendung von Cycloheximid (CHM) oder Chloramphenicol (CAP) gehemmt werden.Zunächst wurde bei einer Kultivierungstemperatur von 27°C in einer Versuchsreihe mit Hilfe von Cycloheximid die cytoplasmatische,in einer anderen durch Chloramphenicol die plastidäre Proteinsynthese unterbunden.Die Abbildung 31 zeigt,

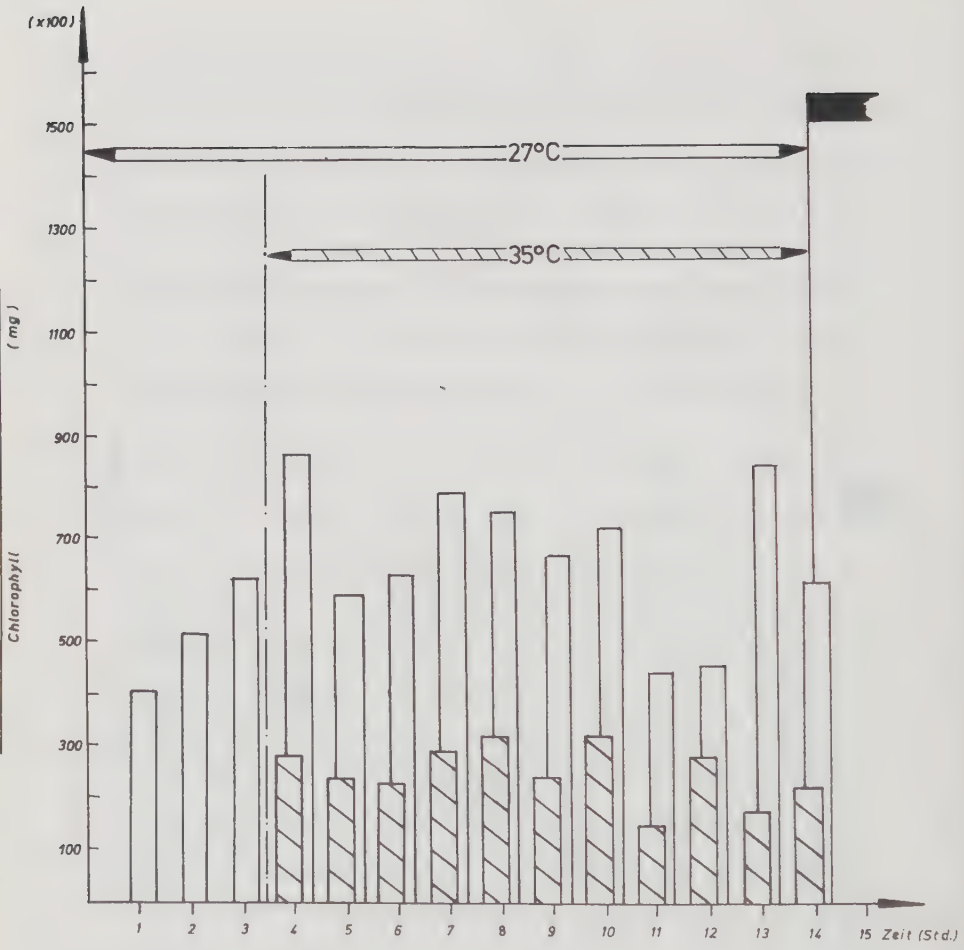

Abb.3o

Synthese von Plastidenproteinen (Einbau von ^{14}C-Leucin) während der Lichtzeit des Zellzyklus einer Synchron= kultur von Euglena gracilis bei 27°C und 35°C

Einbau von ^{14}C-Leucin bei 27°C

Einbau von ^{14}C-Leucin bei 35°C

daß die Synthesemaxima zur 4.,7.,1o.und 13.LST etwa zu gleichen Teilen aus der nukleären und der plastidären Plastidenproteinsynthese herrühren.Insgesamt verläuft die nukleäre Plastidenproteinsynthese während der gesamten Lichtzeit im Zellzyklus von Euglena gracilis kontinuierlicher als die plastidäre Plastidenproteinsynthese.

Bei einer Temperatur von 35°C sind die Einbauraten von ^{14}C-Leucin in die cytoplasmatischen Plastidenproteine nach Vergiftung der plastidären Proteinsynthese durch CAP von der 5.LST bis zur 12.LST bemerkenswerterweise höher als bei der Vergleichskultur bei 27°C (Abb.31); offenkundig steigert die Hemmung der plastidären die nukleäre Plastidenproteinsynthese.Die plastidäre Plastidenproteinsynthese hingegen läuft bei einer Temperatur von 35°C und Vergiftung der nukleären Proteinsynthese durch CHM nur in der 5. und 6.LST mit einer gegenüber den bei 27°C durch CHM vergifteten Zellen gesteigerten Leistung ab.In der übrigen Zeit liegen die Einbauraten des ^{14}C-Leucin in die plastidären Plastidenproteine bei Anwesenheit von CHM niedriger als in der Kontrollkultur.

Die zum Verhalten der Synthese von Plastidenproteinen in der Lichtzeit von Euglena-gracilis-Synchronkulturen bisher vorgestellten Daten sind beispielhaft für die 4. und 8.LST nochmals zusammenfassend in Abb.32

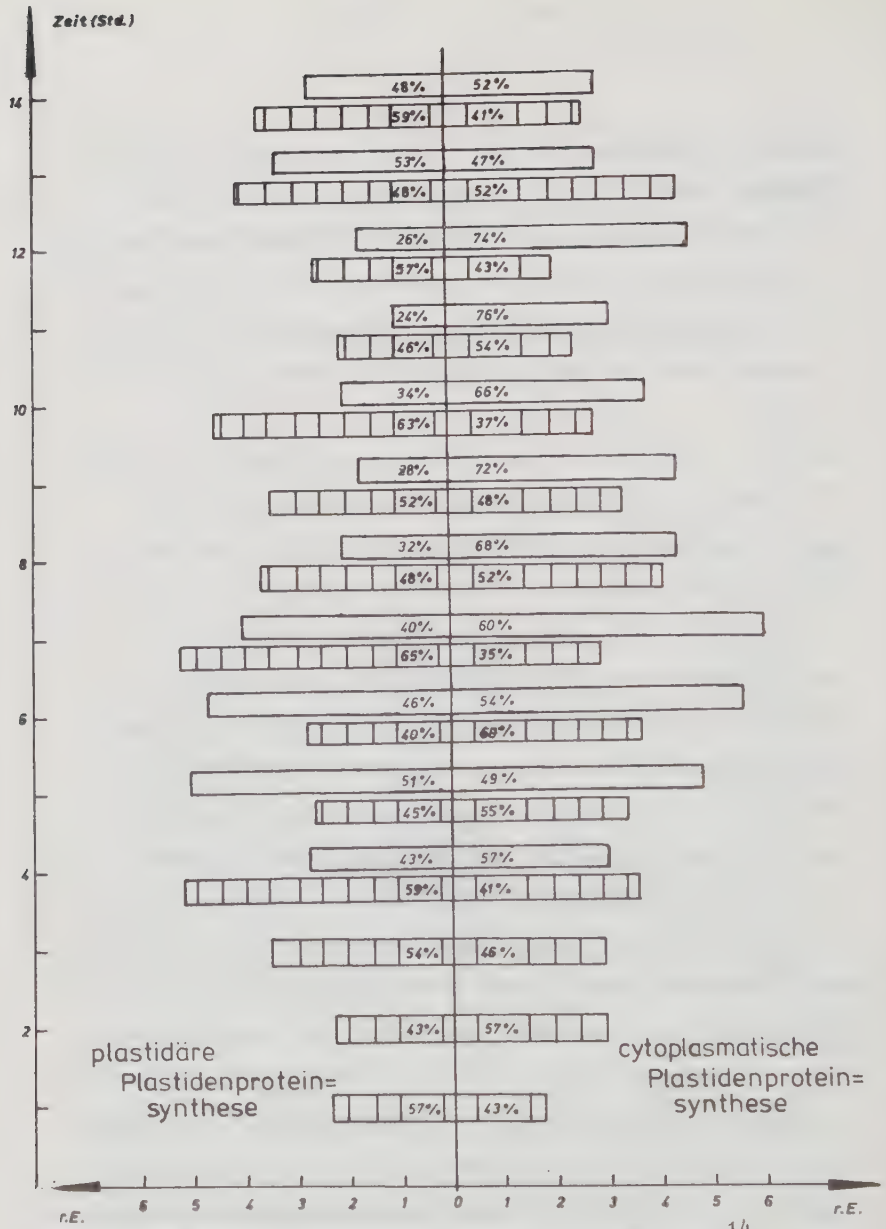

Abb.31 Gesamtplastidenproteinsynthese (Einbau von ^{14}C-Leucin) sowie prozentualer Anteil der cytoplasmatischen und der plastidären Plastidenproteinsynthese an der Gesamtsynthese während der Lichtzeit des Zellzyklus von Euglena gracilis bei einer Anzuchttemperatur von 27°C und von 35°C

▥ 27°C ☐ 35°C

dargestellt worden.Bei 27°C setzt sich in der 4.LST (Abb.32a) in der unvergifteten Kultur die Gesamtsyn= these von Plastidenproteinen (Säule A) aus der nukleären Plastidenproteinsynthese (Säule C) - 4o,7%;bei 27°C nach Vergiftung mit CAP ermittelt - und der plastidären Pla= stidenproteinsynthese (Säule E) - 59,3%;bei 27°C nach Vergiftung mit CHM ermittelt - zusammen.Die Temperatur= erhöhung auf 35°C vermindert die Gesamtsynthese unver= gifteter Zellen (Säule B) um 67%,verglichen mit der Syn= theseleistung bei 27°C (Säule A).Die nukleäre Plastiden= proteinsynthese (Säule D) wird durch diese Temperatur auf 83% (Säule D verglichen mit Säule C),die plastidäre Plastidenproteinsynthese (Säule F) auf 53% (verglichen mit Säule E) verringert.Die Addition der Syntheseleistung in Gegenwart der Hemmstoffe (Säule E+C) ergibt bei 27°C den in den unvergifteten Kulturen ermittelten Wert (Säule A). Bei 35°C jedoch führt diese Berechnung (Addition der Säu= len D und F)zu einer Syntheseleistung,die um 9o% über der der unvergifteten Kulturen liegt (Säule B).Das legt den Schluß nahe,daß zwischen der nukleären und der plastidären Plastidenproteinsynthese eine steuernde Wechselbeziehung vorliegt,die bei 35°C und Hemmung einer von beiden - wie es bei der Anwendung der Gifte CAP oder CHM geschieht - zu einer Mehrproduktion durch die andere führt.In der 8.LST (Abb.32b) treten die für die 4.LST eben geschilderten Ver=

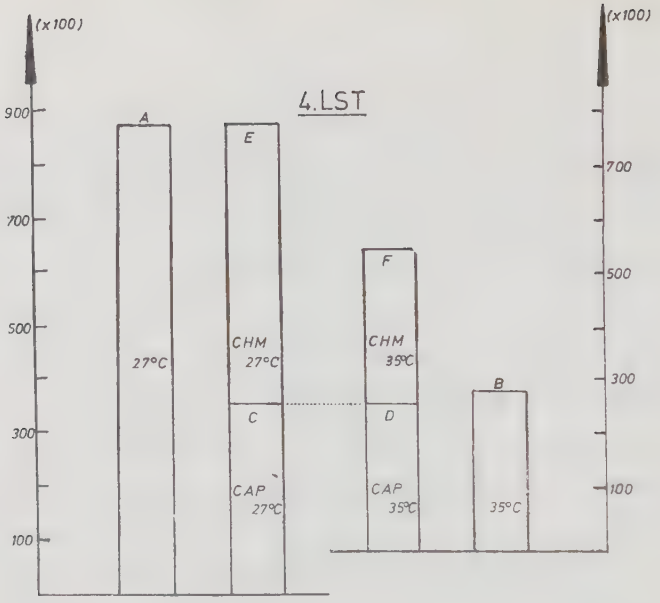

Abb.32a

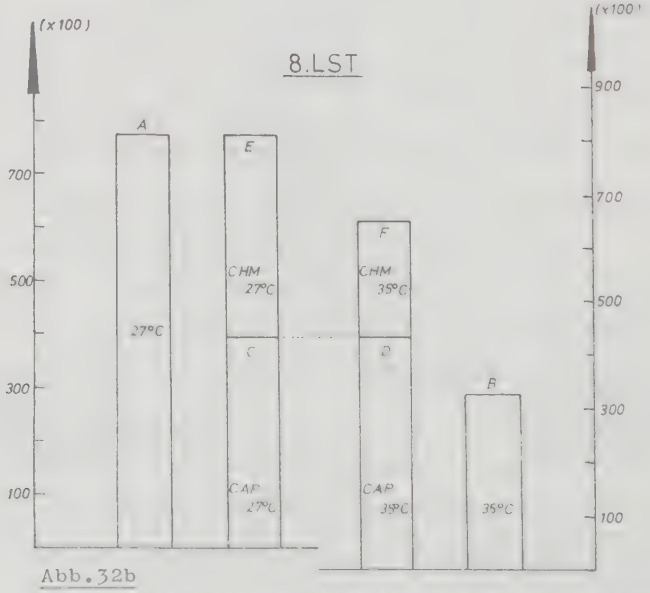

Abb.32b

Einbau von ^{14}C-Leucin (cpm) / Chlorophyll (mg)

Abb.32 Vergleichende Darstellung der Plastidenprotein synthese (Einbau von ^{14}C-Leucin) einer Synchronkultur von Euglena gracilis zur 4.LST bzw. 8.LST ohne bzw. mit Einsatz von Chloramphenicol (CAP) oder Cyclohexi= mid (CHM) bei 27°C bzw. 35°C

hältnisse zwischen nukleärer und plastidärer Plastiden=proteinsynthese noch deutlicher hervor.Verglichen mit der kontrollkultur bei 27°C ist in der 35°C-Kultur die Syn=these der Gesamtplastidenproteine um 6o% gesunken (Säule A verglichen mit Säule B).Bei Einsatz des Hemmstoffes CAP steigt bei dieser Temperatur jedoch die Synthese der nukleären Plastidenproteine sogar über den bei Anwesen=heit dieses Giftes bei 27°C gemessenen Synthesewert an. Diese Beziehungen zwischen der nukleären und der plastidä=ren Plastidenproteinsynthese,die soeben beispielhaft für die 4. und 8.LST erörtert worden sind,sollen nun während der gesamten Lichtzeit des Zellzyklus untersucht werden. Hierzu wurden in Tabelle 4 die Einbauraten von ^{14}C-Leucin in die Plastidenproteine bei Verwendung von CAP bzw. CHM bei 27°C aufgeführt,dargestellt in %,bezogen auf den Einbau von ^{14}C-Leucin bei 27°C durch unvergiftete Zellen. In Tabelle 5 und 6 werden die bei 35°C ermittelten Daten für vergiftete Organismen den bei 27°C und Anwendung von CAP bzw. CHM ermittelten gegenübergestellt,wobei letztere gleich 1oo% gesetzt und die bei 35°C ermittel=ten Einbauraten auf sie bezogen worden sind.Auf diese Weise läßt sich am anschaulichsten die prozentuale Veränderung von plastidärer und nukleärer Plastidenproteinsynthese bei 35°C gegenüber der bei 27°C darstellen.In der Abb.33 sind diese Werte der prozentualen Veränderung graphisch

Tabelle 4:

Plastidenproteinsynthese (Einbau von ^{14}C-Leucin) von Euglena gracilis bei 27°C bzw. 35°C mit bzw. ohne Einsatz von Chloramphenicol (CAP) oder Cycloheximid (CHM); Werte angegeben in % ,bezogen auf den Einbau unter normalen Synchronkulturbedingungen (27°C)

	CAP/27°C	CHM/27°C	27°C	35°C
L1	43,1	56,9	1oo	-
L2	57,2	42,8	1oo	-
L3	45,6	54,4	1oo	-
L4	4o,7	59,3	1oo	32,2
L5	55,3	44,7	1oo	4o,1
L6	6o,o	4o,o	1oo	35,6
L7	34,8	65,2	1oo	35,9
L8	51,9	48,1	1oo	41,9
L9	48,1	51,9	1oo	35,9
L1o	36,9	63,1	1oo	44,o
L11	54,2	45,8	1oo	33,8
L12	43,2	56,8	1oo	62,3
L13	51,6	48,4	1oo	2o,8
L14	41,1	58,9	1oo	36,1

Tabelle 5:

Plastidenproteinsynthese (Einbau von ^{14}C-Leucin) von Euglena gracilis bei 35°C und Vergiftung mit Chloramphenicol (CAP);Werte angegeben in % ;bezogen auf den Einbau bei 27°C und Verwendung desselben Giftes.

	CAP/27°C	CAP/35°C	Veränderung
L4	1oo	83,7	- 16,3
L5	1oo	15o,2	+ 5o,2
L6	1oo	156,9	+ 56,9
L7	1oo	214,5	+114,5
L8	1oo	1o7,1	+ 7,1
L9	1oo	131,5	+ 31,5
L1o	1oo	143,2	+ 43,2
L11	1oo	127,5	+ 27,5
L12	1oo	229,6	+129,6
L13	1oo	63,3	- 36,7
L14	1oo	1o6,3	+ 6,3

Tabelle 6:

Plastidenproteinsynthese (Einbau von ^{14}C-Leucin) von Euglena gracilis bei 35°C und Vergiftung mit Cyclo=heximid (CHM);Werte angegeben in % ;bezogen auf den Einbau bei 27°C und Verwendung desselben Giftes.

	CHM/27°C	CHM/35°C	Veränderung
L4	1oo	55,2	- 44,8
L5	1oo	19o,9	+ 9o,9
L6	1oo	164,6	+ 64,6
L7	1oo	78,6	- 21,4
L8	1oo	56,7	- 43,3
L9	1oo	51,5	- 48,5
L1o	1oo	42,7	- 57,3
L11	1oo	74,9	- 25,1
L12	1oo	65,9	- 34,1
L13	1oo	82,2	- 17,8
L14	1oo	74,3	- 25,7

zusammen mit der Lage der thermosensiblen Abschnitte A und B dargestellt worden.Es ist auf diese Weise ersichtlich,daß bemerkenswerterweise CHM bei 35°C zur 5. und 6.LST eine gesteigerte Synthese von plastidären Plastidenproteinen herbeiführt - also zur Zeit des thermosensiblen Abschnittes A - , CAP dagegen bei dieser Temperatur eine besonders gesteigerte Synthese von cytoplasmatischen Plastidenproteinen in der Zeit von der 5. bis zur 7.LST und zur 12.LST - also sowohl zur Zeit des thermosensiblen Abschnittes A als auch der des thermosensiblen Abschnittes B - herbeiführt.Hieraus kann gefolgert werden (Arbeitshypothese),daß bei der Chloroplastenentwicklung im Laufe des Entwicklungszyklus von Euglena gracilis zwei genetische Realisationssysteme zur Proteinsynthese , nämlich Kern+Cytoplasma und Chloroplasten ,zusammenwirken,deren Reaktionsabläufe zur Zeit der thermosensiblen Abschnitte A und B gegenseitig durch Proteine mit regulatorischen Funktionen (Regulationsproteine) gesteuert werden.
Den erbrachten Befunden zufolge würden zur Zeit des thermosensiblen Abschnittes A sowohl nukleäre als plastidäre Plastidenproteine (nur diese wurden in dieser Arbeit erfaßt)mit regulatorischer Funktion synthetisiert werden, zur Zeit des thermosensiblen Abschnittes B dagegen nur plastidäre Plastidenproteine mit regulatorischer Funktion. Auf die Synthese dieser regulatorischen Plastidenproteine

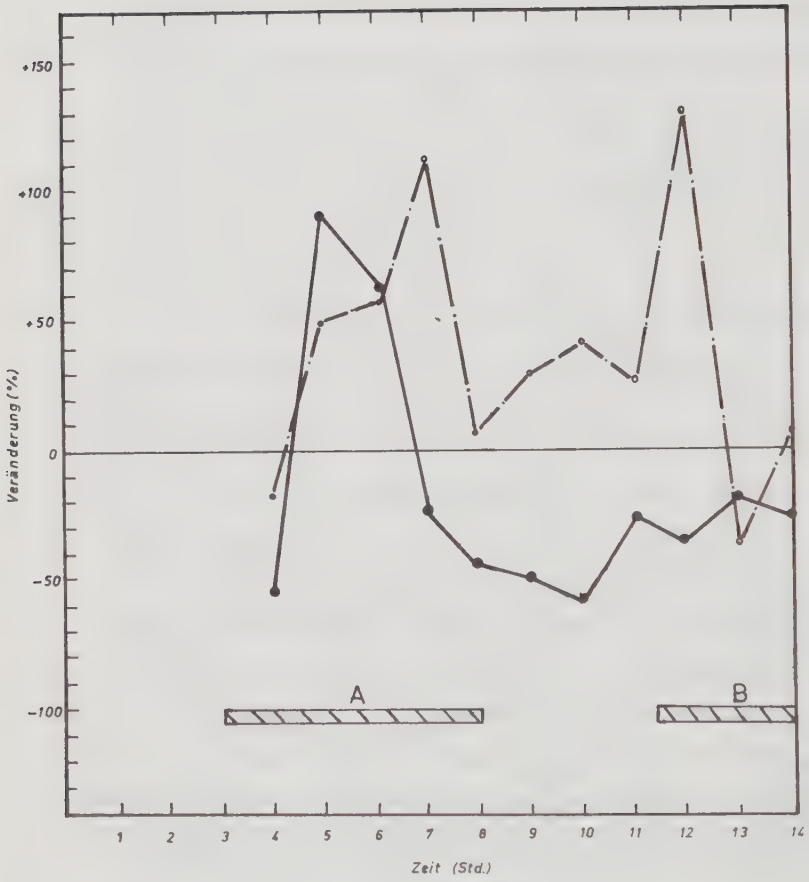

Abb.33

Prozentuale Veränderung der plastidären Plastidenprotein= synthese bei Hemmung der nukleären Plastidenproteinsynthese durch CHM (bei 35°C)(—●—●—),sowie prozentuale Veranderung der nukleären Plastidenproteinsynthese bei Hemmung der plasti= dären Plastidenproteinsynthese durch CAP (bei 35°C)(—o—o—). (A und B (▨) = thermosensible Abschnitte)

hätte die höhere Kultivierungstemperatur ebenso eine hemmende Wirkung wie auch auf die Synthese der anderen Proteine.Die zu regulierenden Synthesen liefen daher bei 35°C - wie alle anderen Proteinsynthesen - zwar auch mit verminderter Intensität ab (direkte Wirkung der höheren Temperatur),jedoch wäre ihre Syntheseleistung in den vergifteten Zellen auf Grund der wegfallenden Steuerung durch die regulierenden Proteine größer als in den unvergifteten (indirekte Wirkung der höheren Temperatur). Trifft diese Hypothese über die Existenz von Steuerproteinen zu,dann sollte es möglich sein,durch Auftrennung des Plastidenproteinmusters diejenigen Proteine zu finden, bei deren Synthese die steuernde Wirkung der Regulationsproteine einsetzt.Daher wurde mittels SDS-Gelelektrophorese das Proteinmuster der Chloroplasten untersucht.Zwar werden durch das Natriumdodecylsulfat (SDS) die Proteine in ihre monomeren Formen zerlegt (Chiba 1960,Itoh et al. 1963,Thornber et al. 1967) und es muß daher bei der elektrophoretischen Auftrennung der Plastidenproteine zu Überlagerungen von gleichen Proteineinheiten unterschiedlicher Herkunft kommen.Dennoch empfiehlt sich diese Methode, da alle Proteine in Lösung gehen,sowohl zur Erfassung der Membran- wie auch der Enzymproteine der Chloroplasten. Allerdings,das sei einschränkend bemerkt,ist zu berücksichtigen,daß hier sowohl die neusynthetisierten als auch

die schon vor Einsatz der Gifte und/oder der höheren Temperatur trotz des turnover noch vorhandenen Plastidenproteine erfaßt werden.Daher braucht die durch Vergiftung gehemmte Synthese eines bestimmten Proteins nicht zu dessen völligem Verschwinden im Proteinmuster zu führen,sondern nur zu einer Verringerung seines prozentualen Anteils am Gesamtprotein!

In den Tabellen 7 und 8 ist die prozentuale Verteilung der Plastidenproteine bei 27°C bzw. bei 35°C aus unvergifteten,sowie aus mit CAP bzw. CHM vergifteten Organismen wiedergegeben.Die Tabelle 7 zeigt,daß die Erhöhung der Temperatur von 27°C auf 35°C das Proteinmuster verändert:

a)fünf Plastidenproteine (21o,19o,17o,16o,15 kdalton) werden zusätzlich synthetisiert,

b)sieben Plastidenproteine (135,12o,1o5,8o,65,55,44 kdalton) werden nicht mehr synthetisiert,

c)vier Plastidenproteine (23o,27,25 und 17,5 kdalton) werden vermindert synthetisiert.

Aus dem Vergleich der prozentualen Verteilung der in unvergifteten sowie in mit CAP bzw.CHM vergifteten Zellen bei 27°C synthetisierten Plastidenproteinen ergeben sich fünf Gruppen, und es kann - unter Beachtung der oben angeführten Vorbehalte in Bezug auf die Wirkungsweise des SDS - eine Deutung der Rolle der einzelnen Plastiden=

Tabelle 7:

Prozentuale Verteilung der Plastidenproteine in unvergifteten Euglenen bei einer Temperatur von 27°C oder von 35°C sowie nach Vergiftung mit CAP bzw. mit CHM.
(Die Algen wurden zur 6.LST "geerntet";Berechnung des Molekulargewichts nach Osborne und Weber (1969);aufgetrennt wurde jeweils die gleiche Proteinmenge.)

Nr.	Molekulargewicht	27°C			35°C ab der 3.LST		
		----	+CHM	+CAP	----	+CHM	+CAP
1	28o ooo	17,8	12,5	17,1	17,o	18,6	12,6
2	25o ooo	16,6	12,o	9,o	15,7	15,2	11,2
3	23o ooo	19,5	8,5	5,9	1o,5	9,3	17,1
4	21o ooo	-	-	-.	6,5	5,9	8,3
5	19o ooo	-	-	-	8,2	5,6	6,9
6	17o ooo	-	-	-	6,8	7,4	6,3
7	16o ooo	-	-	-	4,1	4,3	6,1
8	135 ooo	3,1	6,1	3,5	-	2,7	4,1
9	12o ooo	2,5	3,1	3,4	-	2,9	4,o
1o	1o5 ooo	2,8	3,2	4,7	-	1,9	3,7
11	8o ooo	1,8	1,4	3,8	-	1,2	2,3
12	65 ooo	1,3	2,8	3,7	-	-	1,9
13	55 ooo	1,4	2,8	3,6	-	-	1,8
14	44 ooo	1,9	3,2	3,7	-	-	1,5
15	35 ooo	2,6	3,5	5,9	1,9	1,5	3,o
16	27 ooo	9,2	24,8	13,1	2,5	4,8	3,7
17	25 ooo	8,6	4,2	11,5	3,4	4,2	4,o
18	17 5oo	1o,o	5,2	12,1	5,4	1,4	2,o
19	15 ooo	-	-	-	15,7	12,6	3,9

proteine im Zusammenwirken zwischen Kern+Cytoplasma und Chloroplasten versucht werden:

1.Gruppe

Bei den Plastidenproteinen dieser Gruppe bewirkt die Zugabe von CHM eine prozentuale Abnahme und zeigt die Zugabe von CAP keine Wirkung.Zu ihnen gehört das Protein mit 28o kdalton.Es ist auf Grund der Wirkungsweise des CHM cytoplasmatischen Ursprungs,wird also vom Genom codiert.

2.Gruppe

Sowohl die Zugabe von CAP als auch die von CHM führt eine prozentuale Abnahme herbei.In diese Gruppe gehören die Proteine mit 25o und 23o kdalton.Da beide Gifte deren prozentualen Anteil verändern,sind sie z.T. cytoplasmatischen,z.T. plastidären Ursprungs,werden also z.T. vom Genom und z.T. vom Plastom codiert.

3.Gruppe

Sowohl die Zugabe von CAP als auch von CHM erhöht ihren prozentualen Anteil am Gesamtprotein.Dazu gehören die Proteine mit 12o,65,55,44,35 und 27 kdalton.Diese prozentuale Zunahme bei Vergiftung ist auf die regulatorischen Wechselbeziehungen zwischen cytoplasmatischen und plastidären Plastidenproteinen zurückzuführen.Wird z.B. bei Zugabe von CHM ein cytoplasmatisches Plastidenprotein,das ohne Giftzugabe die Synthese eines plastidären Plastiden-

proteins hemmt,nicht mehr synthetisiert,dann muß es zwangsläufig zu einer Mehrsynthese des zu regulieren= den plastidären Plastidenproteins kommen.Dieser Regula= tionsmechanismus ist aufgrund der Versuchsergebnisse auch umgekehrt vorhanden.

4.Gruppe

Die Zugabe von CHM bewirkt eine prozentuale Abnahme,die Zugabe von CAP eine prozentuale Zunahme.Dazu gehören die Proteine mit 8o,25 und 17,5 kdalton.Es handelt sich bei ihnen somit um cytoplasmatische Plastidenproteine, deren Synthese von plastidären Plastidenproteinen regu= liert wird.

Bei einer Erhöhung der Temperatur auf 35°C wird - wie oben erwähnt - das Proteinmuster mengenmäßig verändert. Ein Vergleich der Ergebnisse läßt folgende Aussagen zu:

1)Drei Proteine (65,55,44 kdalton) treten bei 35°C nur bei Anwesenheit von Chloramphenicol (CAP) auf.Sie werden offenbar (gemäß der oben angeführten Arbeitshypothese) bei Hemmung von plastidären Regulationsproteinen synthe= tisiert,müssen also cytoplasmatischen Ursprungs sein.

2)Vier Proteine (135,12o,1o5 und 8o kdalton) treten bei 35°C nur nach Vergiftung mit CAP oder mit CHM auf,bei Anwendung von CAP mit einem prozentual größeren Anteil. Ihr Auftreten bei Anwesenheit von CHM deutet darauf hin, daß es sich hier um im Plastom codierte,von cytoplasmatischen Proteinen regulierte Proteine handelt.Der Anstieg des prozentualen Anteils derselben Fraktionen bei Anwendung von CAP kann nur dadurch erklärt werden,daß es sich um andere Proteinuntereinheiten cytoplasmatischen Ursprungs handelt,die von plastidären Regulationsproteinen gesteuert werden.

3)Fünf Proteine (21o,19o,17o,16o und 17,5 kdalton) werden bei 35°C neusynthetisiert;sie fehlen im Proteinmuster bei bei 27°C.Angaben über ihre Zugehörigkeit zum cytoplasmatischen oder plastidären "System" können auf Grund der prozentualen Verteilung nicht mit Sicherheit gegeben werden.

Zum Vergleich dieser Ergebnisse über die Wirkung der höheren Temperatur auf das Proteinmuster der Chloroplasten zur 6.LST des Entwicklungszyklus von Euglena gracilis wurden die Plastidenproteine der 12.LST aufgetrennt.

Es lassen sich 13 verschiedene Proteine nachweisen (Tabelle 8).Einige von ihnen sind mit den zur 6.LST vorhandenen

Tabelle 8:

Prozentuale Verteilung der Plastidenproteine in unvergifteten Euglenen bei einer Temperatur von 27°C oder von 35°C sowie nach Vergiftung mit CAP bzw. mit CHM.
(Die Algen wurden zur 12.LST "geerntet";Berechnung des Molekulargewichts nach Osborne und Weber (1969);aufgetrennt wurde jeweils die gleiche Proteinmenge.)

Nr.	Molekulargewicht	27°C			35°C ab der 1o.LST		
		----	+CHM	+CAP	----	+CHM	+CAP
I	235 ooo	2o,5	17,4	19,7	18,o	11,3	1o,8
II	19o ooo	13,7	12,5	11,o	12,6	1o,8	9,3
III	17o ooo	8,9	1o,o	11,2	11,8	12,8	9,4
IV	145 ooo	7,3	13,4	7,7	12,3	15,1	9,5
V	12o ooo	5,7	8,9	6,2	12,1	12,7	11,o
VI	92 ooo	4,4	8,8	4,6	11,4	11,o	1o,8
VII	69 ooo	3,4	7,7	2,7	5,5	9,7	1o,5
VIII	48 ooo	1,6	2,2	1,9	3,4	4,5	3,1
IX	32 ooo	3,o	2,o	3,5	3,8	2,7	3,8
X	17 5oo	5,1	2,o	2,2	1,o	o,9	2,o
XI	12 8oo	5,5	1,8	4,6	1,8	2,6	3,8
XII	11 5oo	7,6	3,8	7,3	2,1	2,4	2,o
XIII	1o 7oo	13,2	9,4	17,7	8,6	3,5	14,1

Plastidenproteinen kongruent.So weisen folgende Plasti=denproteine dasselbe Molekulargewicht auf: Nr.3 (der Tabelle 7) und Nr.I (der Tabelle 8)(235 kdalton),Nr.5 und Nr.II (19o kdalton),Nr.6 und Nr.III (17o kdalton), Nr.9 und Nr.V (12okdalton),Nr.12 und Nr. VII (65 bzw. 69 kdalton),Nr. 15 und Nr.IX (35 bzw. 32 kdalton) sowie Nr.18 und Nr. X (17,5 kdalton).Die höhere Kultivierungs=temperatur hemmt zur 12.LST die Synthese keines Plastiden=proteins völlig.Sechs Plastidenproteine (235,19o, 17,5 , 12,8 11,5 und 1o,7 kdalton) werden vermindert syntheti=siert.Der prozentuale Anteil von sieben anderen Plasti=denproteinen nimmt sogar zu (17o,145,12o,92,69,48 und 32 kdalton).

Da somit zur 12.LST die höhere Temperatur weder die Syn=these bestimmter Plastidenproteine völlig unterbindet, noch andere völlig neu synthetisiert werden,sind Aussagen über die Zugehörigkeit der einzelnen Proteine entweder zu den plastidären oder zu den cytoplasmatischen Plastiden=proteinen nicht eindeutig möglich.Ein Vergleich der Wir=kung der beiden Gifte bei 27°C und 35°C auf die Plastiden=proteine gestattet aus ähnlichem Grunde nur die Aussage, daß durch die höhere Kultivierungstemperatur die Regula=tionsvorgänge zwischen einem Teil der Plastidenproteine verändert worden sein müssen.

Ergebnis:

1.Die höhere Temperatur (35°C) bewirkt eine Senkung der Plastidenproteinsythese auf durchschnittlich 4o % .

2.Die höhere Temperatur (35°C) bewirkt darüber hinaus eine Verschiebung im Proteinmuster der Plastidenproteine.

3.Die höhere Temperatur (35°C) beeinflußt Regulationsvor= gänge zwischen Kern+Cytoplasma und Chloroplasten auf der Ebene von Regulationsproteinen.

3.4.3. Veränderungen in der Synthese und dem Bestand an Plastidenproteinen während der Wärmebehandlung

Nachdem somit geklärt ist,daß durch die Wärmebehandlung die Neusynthese von Plastidenproteinen gesenkt wird, ist nun zu untersuchen,ob und gegebenenfalls in welcher Weise der bereits vorhandene Bestand an Plastidenproteinen durch die Bleichbehandlung beeinflußt und gegebenenfalls verändert wird.Hierzu wurde der Einbau von ^{14}C-Leucin als Maß für die Neusynthese bestimmt und der Gehalt an Plastidenproteinen auf den ^{14}C-Leucin-Einbau bezogen. In Abbildung 34 sind die Veränderungen dieses Quotienten während der Wärmebehandlung bei 35°C und im Kontrollversuch bei 27°C dargestellt.Bei 27°C ergibt sich während der gesamten Versuchszeit von 15o Stunden im Dauerlicht ein nahezu konstanter Wert für das Verhältnis der vorhandenen Plastidenproteinen zu den neusynthetisierten.Bei 35°C dagegen sinkt der Quotient kontinuierlich ab,ist nach etwa 12o Std. Wärmebehandlung nicht mehr meßbar und erbringt durch Extrapolation etwa zur 155 Std. den Wert Null.Dies bedeutet,daß durch die Wärmebehandlung nicht nur,wie im vorangegangenen Kapitel nachgewiesen,die Neusynthese beeinflußt wird,sondern auch der vorhandene Bestand an Plastidenproteinen.Da nämlich die höhere Kultivierungstemperatur eine Hemmung der Neusynthese der

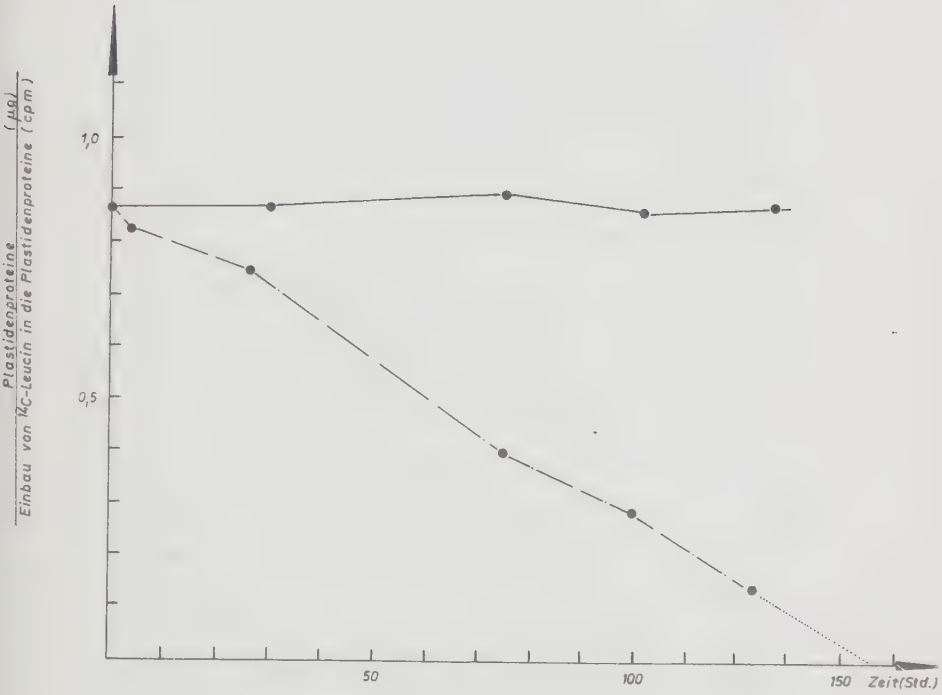

Abb.34

Veränderungen des Verhältnisses der vorhandenen/neusyn= thetisierten Plastidenproteinen von Euglena gracilis, Stamm Z bei 27°C und 35°C.Die Algen wurden zur 6.LST der Synchronkultur entnommen und der Wärmebehandlung bei Dauerlicht unterworfen.

—●———●— 27°C + Dauerlicht
—●—·—●— 35°C + Dauerlicht

Plastidenproteine um 6o% bewirkt,müßte der Quotient im Laufe der Wärmebehandlung,wenn der vorhandene Proteinbestand unbeeinflußt bliebe,zunehmen,da die Bezugsgröße Neusynthese an Plastidenproteinen im Nenner des Quotienten steht.Für die Abnahme des Quotienten kann daher nur ein absinkender Gehalt an vorhandenen Plastidenproteinen verantwortlich sein,möglicherweise auf Grund eines (u.U. durch die höhere Kultivierungstemperatur) beschleunigten Abbaus derselben.

3.4.4. Einfluß der höheren Temperatur auf die RNS plastidärer und nukleärer Herkunft

Es bleibt nun zu untersuchen, auf welcher Stufe des zur Proteinbiosynthese führenden Gesamtvorgangs - der Transskription oder der Translation - die höhere Temperatur einwirkt und so - wie in Kapitel 3.4.2. ausgeführt - die Synthese von Plastidenproteinen um 60% senkt. Hierzu wurden zunächst der Verlauf der RNS-Synthese während der Lichtzeit des Zellzyklus von Euglena gracilis bei 27°C und der bei 35°C miteinander verglichen (Abbildung 35a und b). Dies geschah durch Einbau von ^{3}H-Adenin in die Gesamt-RNS (aus der Zelle extrahiert) und in die plastidäre RNS (aus isolierten Chloroplasten extrahiert). Dieser Einbau von ^{3}H-Adenin wurde auf den Proteingehalt der Zelle bzw. der Plastiden bezogen. Es zeigte sich, daß die Gesamt-RNS bei 27°C im Zellzyklus von der 0. bis etwa zur 10. LST synthetisiert wird, hingegen sinkt die Synthese plastidärer RNS zur 3. und 10. LST ab. Ihr Synthesemaxima liegen in der 1., 7. und 14. LST. Eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 35°C zur 3. LST (Beginn des thermosensiblen Abschnittes A) bzw. zur 10. LST (Beginn des thermosensiblen Abschnittes B) bewirkt 2 Stunden nach der Temperaturerhöhung eine Zunahme und nach 4 Stunden eine Abnahme des auf den Proteingehalt der Zelle bezogenen ^{3}H-Adenin-Einbaus in die Ge-

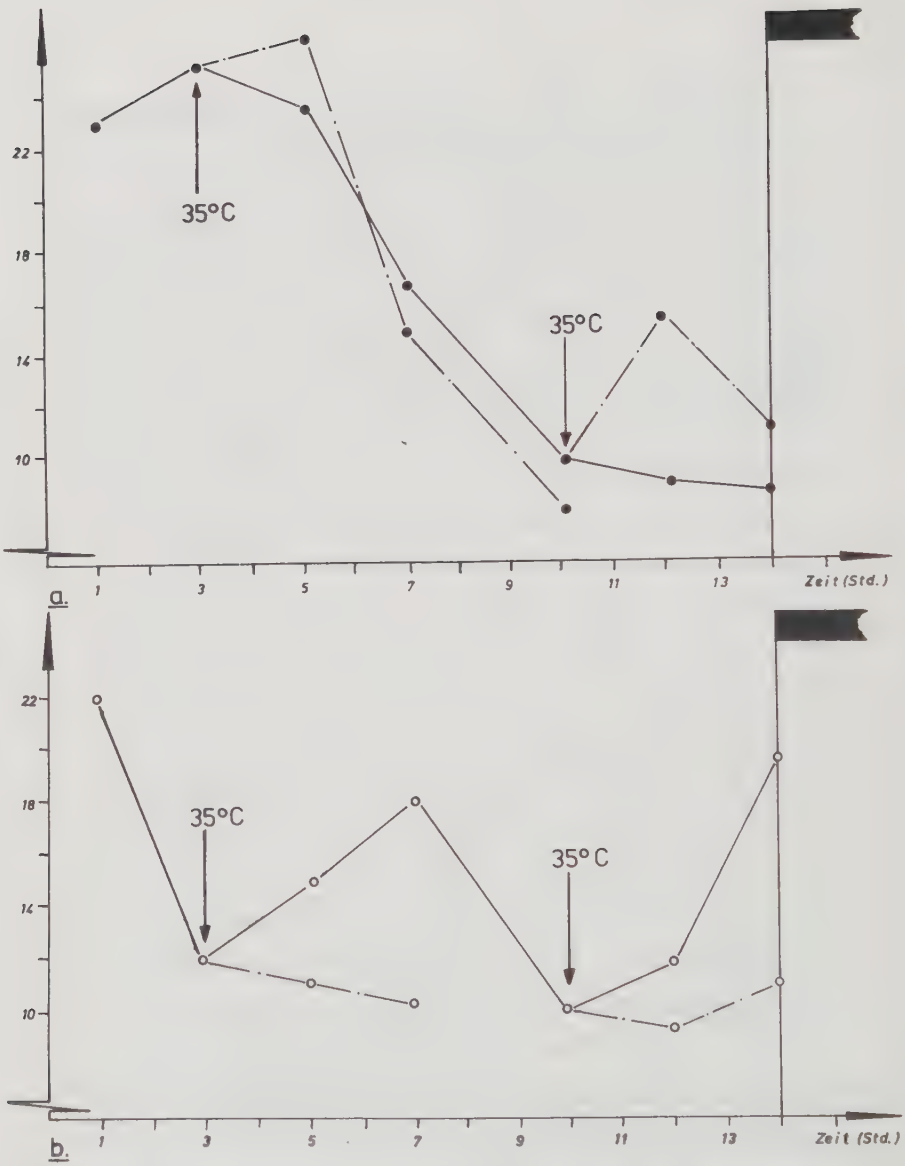

Abb.35 Synthese der Gesamt-RNS (35a,●) und der plastidären RNS (35b,o)(Einbau von ^{3}H-Adenin) von Euglena gracilis,Stamm Z bezogen auf den Proteingehalt der Zelle bzw.der Chloroplasten bei 27°C (——) und bei 35°C (–·—·)

samt-RNS.Berücksichtigt man die in Kapitel 3.4.2. nachgewiesene Hemmung der Plastidenproteinsynthese durch die höhere Kultivierungstemperatur,dann kommt als Ursache dieser Zunahme des Quotienten 2 Std. nach Temperaturerhöhung nicht eine verstärkte Gesamt-RNS-Synthese,sondern eher die Hemmung der cytoplasmatischen Translation in Betracht.Das Absinken des Quotienten 4 Std. nach Temperaturerhöhung dagegen beruht aber,da der Proteingehalt fortlaufend weiter sinkt (also der Nenner des Quotienten laufend kleiner wird),auf einer Hemmung der nukleären Transkription als Folge der Einwirkung der höheren Kultivierungstemperatur von 35°C.Bei der Synthese der plastidären RNS tritt diese zeitliche Verzögerung der Transkription nicht auf.Hier sinkt der Wert des Quotienten sofort mit Beginn der Temperaturerhöhung auf 35°C ab;d.h. die höhere Kultivierungstemperatur hemmt sofort die plastidäre Transkription völlig.

Ergebnis:

Als Initialschädigung der bei Euglena gracilis zur Apochlorose führenden Einwirkung der Temperatur von 35°C konnte somit eine direkte selektive Beeinflussung der plastidären Transkription nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Die hier vorgelegten Ergebnisse beweisen, daß die unterschiedliche Beeinflussung der nukleären und plastidären Transkription durch eine Temperatur von 35°C während der Kultivierung von Euglena gracilis im Dauerlicht zu einer Störung der den Gesamtorganismus steuernden Wechselbeziehungen zwischen Chloroplasten und übriger Zelle und damit zum Verlust der Chloroplasten und permanenter Apochlorose führt. Diese unterschiedliche Thermosensibilität der nukleären und plastidären Transkription ist damit das wesentliche und grundlegende zur Apochlorose führende Phänomen. Denn einerseits ist Euglena gracilis auch bei 35°C in der Lage - wenn auch mit verminderter Leistung - zu wachsen und sich zu vermehren und kann die geringe Beeinflussung der nukleären Transkription durch die Temperatur von 35°C im Gegensatz zum Verhalten der plastidären Transkription durch "normale" Kulturbedingungen wieder aufgehoben werden: die Wachstumsraten der unter Temperatureinfluß gebleichten Euglenen sind unter optimalen kulturbedingungen von 27°C denen der grünen Wildform vergleichbar. Andererseits ist die durch genügend lange Wärmebehandlung herbeigeführte Beeinflussung der plastidären Transkription irreversibel: keine Vermehrung der Chloroplasten bei 35°C und schließlicher totaler Verlust der Chloroplasten, der bei 27°C

nicht wieder rückgängig zu machen ist.Daß die Temperatur von 35°C auf der Ebene der Transkription unterschiedlich wirkt,wird dadurch bewiesen,daß der Einbau von ^{3}H-Adenin in die Gesamt-RNS durch Einwirkung der höheren Tempera= tur nur unwesentlich gehemmt,der Einbau von ^{3}H-Adenin in die plastidäre RNS hingegen völlig unterbrochen wur= de.Die Chloroplasten können daher als Folge dieser Hem= mung ihrer plastidären Transkription plastidäre Proteine nur noch mit Hilfe des vor Temperatureinwirkung vorhande= nen Bestandes an plastidären Ribosomen,t-RNS und m-RNS, die alle im Zuge des turnover einem Abbau unterworfen sind,in fortlaufend abnehmendem Maße synthetisieren.Dies Defizit an plastidären Plastidenproteinen wirkt sich auf zweierlei Weise aus:

1.Es konnte durch die Einbauversuche mit ^{14}C-Leucin und die Versuche über die Folgen einer Hemmung der plastidären Proteinsynthese auf die Synthese nukleärer Proteine bzw. die Folgen einer Vergiftung der nuklearen Proteinsynthese auf die Synthese plastidarer Proteine nachgewiesen werden, daß ein Regulationsmechanismus auf Proteinbasis zwischen beiden Mechanismen der Proteinbiosynthese existiert,der die Synthesen der z.T. im Plastom und z.T. im Genom codier= ten "Chloroplastenbausteine" koordiniert.Dieser bei 27°C vorhandene Regulationsvorgang wird durch die bei 35°C ver= minderte Synthese von Plastidenproteinen gestört.

2.Auf Grund des turnover werden bei gleichzeitig unzureichender Neusynthese von Plastidenproteinen die vorhandenen Strukturen des Chloroplasten (Membranen) abgebaut,wie das bei Wärmebehandlung auftretende Absinken des Quotienten Proteingehalt der Chloroplasten/Einbaurate an ^{14}C-Leucin beweist.Dies muß eine Abnahme der physiologischen Leistung der Chloroplasten zur Folge haben.

Zu Beginn der Wärmebehandlung (erste drei Stunden) wird die plastidäre DNS verstärkt synthetisiert.Dies steht nur scheinbar im Widerspruch zu den Untersuchungen von Uzzo und Lyman (1971),denen zufolge der Gehalt an plastidärer DNS während der Wärmebehandlung sinkt,sowie zu den Untersuchungen von Edelmann,Schiff und Epstein (1965), daß hitzegebleichte Euglenen keine plastidäre DNS und keine Chloroplasten mehr enthalten.Ahnlich wie bei Bakterien (Knippers und Stratling 197o) besitzt die plastidäre DNS von Euglena gracilis eine Membrananheftungsstelle (Manning,Wolstenhome,Ryan,Hunter und Richards 1971),die aus einem Membranproteinkomplex besteht und für die Replikation der plastidären DNS verantwortlich sein und dadurch auch mit der Plastidenteilung in Verbindung stehen soll.Da die Membranproteine einem relativ langsamen turnover unterworfen sind (Ohad,Eytan,Jennings, Goldberg,Bar-Nun und Wallach 1971),kann gefolgert werden,

daß der Membranproteinkomplex zu Beginn der Warmebehandlung trotz der nachgewiesenermaßen verminderten Synthese von Plastidenproteinen für die plastidäre DNS-Replikation noch voll funktionsfähig ist.Erst im Verlauf der fortschreitenden Wärmebehandlung wird auch dieser Komplex in die Störung des Proteinstoffwechsels einbezogen und werden damit die plastidäre DNS-Replikation und die Chloroplastenteilung verhindert.

Die Untersuchungen haben ferner gezeigt,daß die durch die höhere Temperatur hervorgerufenen Schädigungen des plastidären Realisationssystems der genetischen Information bei einer Einwirkungszeit von weniger als 1oo Std. reversibel ist.Das bedeutet,daß innerhalb dieser Zeit das zur Ausbildung von Chloroplasten benötigte genetische Material noch nicht vollständig geschädigt ist.Dies stimmt mit den Ergebnissen von Uzzo und Lymann (1971) überein,die zur 7o.Std. der Wärmebehandlung noch plastidäre DNS nachweisen konnten: von Euglenen,die zu dieser Zeit bei 27°C weiterkultiviert wurden,ergrünten 3% wieder.Eigenen Zählungen zufolge besitzt Euglena gracilis zu Beginn der Wärmebehandlung etwa 11 Chloroplasten pro Zelle. 7o Std. später haben,da bei der höheren Temperatur die Chloroplastenteilung unterbleibt, 63% der Tochterzellen einer Euglene je 1 und 37% je 2 Chloroplasten pro Zelle.Jede weitere Zellteilung bei 35°C erhöht die Zahl der apo-

plastidischen Zellen gegenüber denjenigen,in denen noch Chloroplasten verblieben sind,die aber mangels ausreichender Plastidenproteinsynthese abgebaut werden. Bemerkenswerterweise ist die fortlaufende Zellteilung bei der höheren Temperatur für Erreichung des irreversiblen Chloroplastenverlustes besonders wichtig,da nachweislich die Zahl der Chloroplasten in Zellen,die sich nicht teilen,bei 35°C nicht abnimmt.Somit führt die Temperatur von 35°C über die Hemmung der plastidären Transkription und ihren Folgewirkungen zu einer Entkopplung von Zell- und Chloroplastenteilung,die bei 27°C den Kulturbedingungen (Licht und Nährmedium) entsprechend aufeinander abgestimmt sind (Schiff 1973).

Eine Folgewirkung der Hemmung der plastidären Transkription ist auch das phänotypische "Ausbleichen" der Euglenen während der Wärmebehandlung,das auf einen langsamen Verlust des Chlorophylls zurückgeht und auf zweierlei Weise,gestützt durch von anderer Seite bereits vorliegende Untersuchungen,erklärt werden kann:

1. Durch die von der höheren Temperatur gehemmte Transkription werden die zur Chlorophyllsynthese notwendigen Enzyme nicht mehr synthetisiert und die Chlorophyllsynthese läuft damit entweder garnicht mehr oder nur bis zu einem bestimmten Zwischenprodukt ab.Hierfür sprechen die Versuche von Uzzo und Lyman (1969),die in hitzegebleichten,

chlorophyllfreien Euglenen größere Mengen von δ-Amino=lävulinsäure nachweisen konnten.

2.Die Hemmung der Transkription beeintächtigt die Syn=these der Membranproteine des Chloroplasten,die die Chlorophyllsynthese aktivieren sollen,und durch den Aus=fall der Membranproteine kommt die Chlorophyllsynthese zum Stillstand.Für eine derartige Wechselbeziehung zwi=schen Chlorophyllsynthese und Membranproteinen sprechen für Chlamydomonas reinhardi erbrachte Befunde (Ohad et al. 1971)

Zu diskutieren ist in Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit das Denkmodell,daß die höhere Temperatur zusatzlich zur Hemmung der plastidären Transkription mutagen auf das Plastom einwirken könnte.Aus mehreren Gründen erscheint dies jedoch wenig wahrscheinlich:

a)Bekanntermaßen ahnelt die plastidare DNS der bakteriel=len DNS in vieler Hinsicht.Sie ist wie diese histonfrei und wenigstens zu bestimmten Zeiten des Entwicklungszyk=lus in Anheftungsstellen mit einer Membran verbunden. Nach Jacob,Brenner und Cuzin (1963) und Hirota,Ryter und Jacob (1968) hat die höhere Temperatur von 35°C auf die bakterielle DNS keinerlei Wirkung,weder auf die Re=plikation noch als mutagener Faktor.Da hier auch für Eu=glena gracilis keine direkte Wirkung auf die plastidäre DNS-Replikation bei 35°C nachgewiesen werden konnte,er=

scheint somit auch eine mutagene Wirkung der höheren Temperatur auf die plastidäre DNS unwahrscheinlich.

b)Wenn man als Maß für die durch höhere Temperatur bedingte"Mutationsanfälligkeit" den Guanin-Cytosin-Gehalt der DNS auswählt,so wäre die Möglichkeit der durch die höhere Temperatur von 35°C bewirkten Punkmutation für die nukleäre und die mitochondriale DNS genauso wie für die plastidäre DNS gegeben,da ihr G-C-Gehalt (zwei Drittel des Plastoms haben einen G-C-Gehalt von 25%,ein Drittel des Plastoms einen G-C-Gehalt von 41% (Crouse, Vandrey und Stutz 1974;Stutz und Vandrey 1971)) zum Teil etwa mit der nukleären DNS (G-C-Gehalt von 49% (Brawermann und Eisenstadt 1964a und 1964b)) übereinstimmt und zum Teil sich nur wenig von der mitochondrialen DNS (G-C-Gehalt von 35% (Brawermann und Eisenstadt 1964a und 1964b)) unterscheidet.Da aber die apochlorotischen Euglenen mit Ausnahme des Chloroplastenverlustes keine phänotypischen Unterschied morphologischer oder cytologischer Art im Vergleich mit der Wildform zeigen, können weder in der mitochondrialen noch der nukleären DNS durch die höhere Temperatur Punkmutationen bewirkt worden sein.Daher ist auch diese Art der Wärmewirkung mit Sicherheit abzulehnen.

Der Ablauf der durch eine Wärmebehandlung von 35°C be=
wirkten Umwandlung von grünen Euglenen zu apochloroti=
schen Organismen stellt sich somit auf Grund der hier vor=
gelegten Ergebnisse folgendermaßen dar (Abb.36):
Die höhere Temperatur von 35°C hemmt die plastidäre
Transkription.Da gleichzeitig die vorhandene plastidäre
RNS dem normalen Abbau unterworfen ist und die regulie=
rende Koordination der plastidären und cytplasmatischen
Synthese von Plastidenproteinen gestört wird,sinkt die
Intensität der plastidären Translation in zunehmendem
Maße ab.Durch Verlust der inneren Membranstrukturen des
Chloroplasten wird wahrscheinlich auch der Membranprotein=
komplex der Anheftungsstelle der plastidären DNS in Mit=
leidenschaft gezogen und die plastidäre DNS-Replikation
unmöglich gemacht.Die Chloroplastenteilung kommt zum
Stillstand,die Zellteilung hingegen nicht.Die verblei=
benden Chloroplasten werden als Folge des zunehmenden
Plastidenproteindefizits abgebaut.Nach einer Wärmebe=
handlung von 12o Std. tritt die irreversible Apoplasti=
die ein.

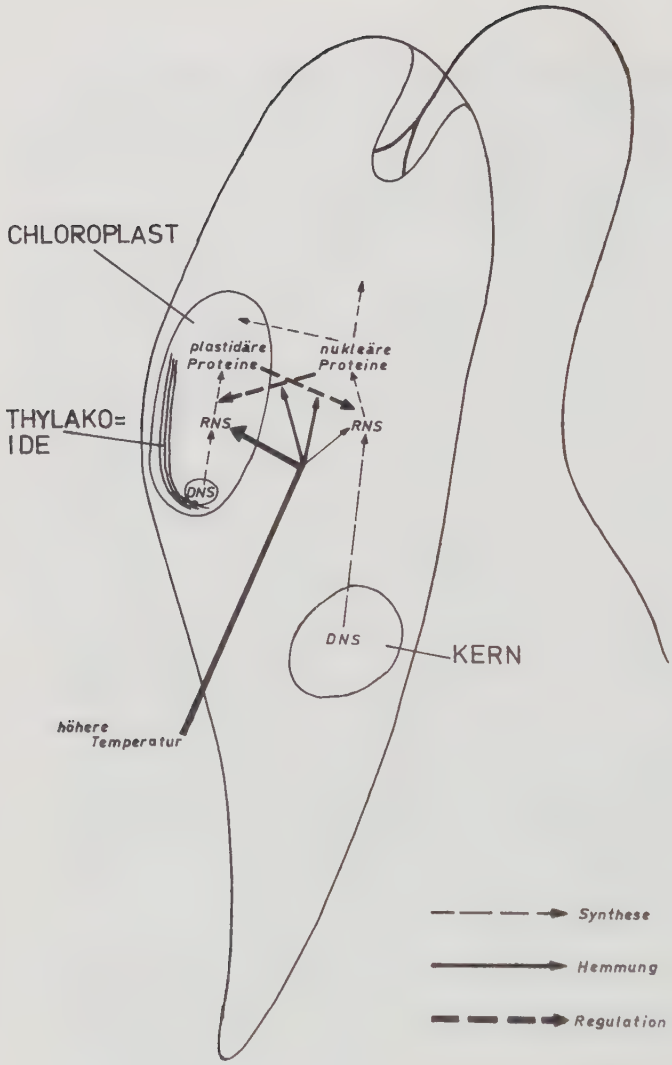

Abb.36

Schematische Darstellung der Wirkungsweise der höheren Tempe=
ratur (35°C) auf die"Realisationssysteme" der genetischen In=
formation von Kern und Chloroplast bei Euglena gracilis,Stamm Z

5. Zusammenfassung

a)Es wurde eine Methode zur Erzeugung permanent chloro=phyllfreier Kulturen von Euglena gracilis entwickelt:Das Ausgangsmaterial ist zur 6. oder 14.Stunde der Lichtzeit einer Synchronkultur von Euglena gracilis zu entnehmen (Sychronisationsbedingungen: Licht-Dunkel-Wechsel von 14:$\overline{1o}$ Stunden;27°C;9ooo Lux),auf eine Zelldichte von weniger als 1,4 . $1o^4$ Zellen/ml einzustellen und nach Glucose-,Äthanol- oder Natriumacetatzusatz (1%) 12o Std. lang einer Wärmebehandlung zwischen 34° und 35°C bei Dauerlicht zu unterwerfen.

b)Die Erzeugung einer irreversiblen Apochlorose ist bei Euglena gracilis,Stamm Z unabhängig von der Art der zu=gesetzten Kohlenstoffquelle,nicht hingegen bei Stamm T.

c)Zur Erreichung der irreversiblen,1oo%igen Apochlorose muß das Algenmaterial der Synchronkultur während bestimm=ter thermosensibler Abschnitte (A 3.-8.LST und B 1o.LST--2.DST) des Zellzyklus entnommen werden und müssen die Euglenen eine 5- bis 6malige Zellteilung während der Wärmebehandlung von 12o Std. durchführen.

d)Bei der Wirkungsweise der Temperatur von 35°C lassen sich eine Initial- und Folgewirkungen unterscheiden: Initialwirkung ist die Hemmung der plastidaren Transkrip=tion.(Die nukleäre Transkription wird nur unwesentlich gehemmt.)Folgewirkung ist eine Herabsetzung der plasti=dären Proteinsynthese und der plastidären DNS-Replikation.

Die Herabsetzung der plastidären Proteinsynthese bei 35°C ermöglicht es,Wechselbeziehungen zwischen der plastidären und der cytoplasmatischen Plastidenproteinsynthese nachzuweisen:plastidäre Plastidenproteine steuern die Synthese cytoplasmatischer Plastidenproteine und vice versa.

e)Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit von anderer Seite erbrachten Befunden diskutiert.

6.Literaturverzeichnis

(1)App,A.A. und Jagendorf,T.:Repression of chloroplast development in Euglena gracilis by substrates.J.Protozool. 1o,34o-343 (1963)

(2)Bates,R.C. und Hurlbert,R.E.:The effect of acetate on Euglena gracilis var. bacillaris as a function of environment conditions.J.Protozool.17,134 (197o)

(3)Blum,J.J. und Buetow,D.E.:Biochemical changes during acetate deprivation and replikation in Euglena.Expt.Cell Research 29,4o7-421 (1963)

(4)Bradstreet,R.B.:The Kjeldahl method for organic nitrogen. Acad.Press, 239

(5)Brawermann,G.:The isolation of a specific species of ribosomes associated with chloroplasts development in Euglena gracilis.Biochim.Biophys.Acta 72,317-331 (1963)

(6)Brawermann,G. und Eisenstadt,J.M.:Template and ribosomal ribonucleic acids associated with the chloroplasts and the cytoplasm of Euglena gracilis.J.Mol.Biol. 1o,4o3-411 (1964a)

(7)Brawermann,G. und Eisenstadt,J.M.:Deoxyribonucleic acid from the chloroplasts of Euglena gracilis.Biochim.Biophys. Acta 91,477-485 (1964b)

(8)Buetow,D.E.:Ethanol stimulation of oxidative metabolism in Euglena gracilis.Nature 19o,1196 (1961)

(9)Celmer,W.D. und Ebringer,L.:Effects of certain o-acyl derivatives of oleandromycin and erythromycin on chloroplasts of Euglena gracilis.J.Protozool. 14,263-267 (1967)

(1o)Ceriotti,G.:A new technique for the determination of DNA. J.Biol.Chem. 198,297-299 (1952)

(11)Chiang,K.-S. und Sueoka,N.:Replication of chloroplast DNA in Chlamydomonas reinhardi during vegetative cell cycle: Its mode and regulation.Proc.Natl.Acad.Sci.(Wash.) 57,15o6-1513 (1967)

(12)Chiba,Y.:Electrophoretic and sedimentation studies on chloroplast proteins solubilized with surface-active agents.Arch.Biochem.Biophys. 90,294-303 (1960)

(13)Cook,J.R.:Ultraviolet-induced apochlorosis and photoreactivation in two strains of Euglena gracilis.Photochem. Photobiol. 2,407-410 (1963)

(14)Cook,J.R.:The synthesis of cytoplasmatic DNA in synchronized Euglena.J.Cell Biol. 29,369-373 (1966)

(15)Cook,J.R.:Photoassimilation of acetate by an obligate phototrophic strain of Euglena gracilis.J.Protozool. 14,382-284 (1967)

(16)Cook,J.R.:Irreversible plastid loss in Euglena gracilis under physiological conditions.Plant Phys. 53,284-290 (1974)

(17)Cook,J.R. und Heinrich,B.:Glucose vs. acetate metabolism in Euglena.J.Protozool. 12,581-583 (1965)

(18)Cook,J.R. und Heinrich,B.:Unbalanced respiratory growth by Euglena.J.Gen.Microbiol. 53,237-251 (1968)

(19)Cook,J.R. und James:Light-induced division synchr. in Euglena gracilis var. bacillaris.Expt.Cell.Res. 21,583-589 (1966)

(20)Crouse,E.,Vandrey,J. und Stutz,E.:Comparative analyses of chloroplast and mitochondrial DNAs from Euglena gracilis.Proceedings of the Third International Congress on Photosynthesis,Rehovot,1775-1786 (1974)

(21)Danforth,W.F.:Oxidative assimilation of acetate by Euglena.Carbon balance and effect of ethanol.J.Protozool. 8, 152-158 (1961)

(22)Danforth,W.F. und Wilson,B.W.:Adaptive changes in the acetate metabolism of Euglena.J.Protozool. 4,52-55 (1957)

(23)Deken-Grenson,M.de und Messin,S.:La continuite genetique des chloroplastes chez les euglenes,1.Mecanisme de l`apparition des lignees blanches dans les cultures traitees par le streptomycine.Biochim.Biophys.Acta 27, 145-155 (1958)

(24)Drown,D. und Galloway,A.R.:Mechanism of action of streptomycin in Euglena gracilis.Arch.Mikrobiol. 68,377-386 (1969)

(25)Dusi,H.:La chlorophylle rend les plastes d`une euglene insensible a la streptomycine.C.R.Ac.Si.Paris 237,1795-1797 (1953)

(26)Ebringer,L.:Erythromycin-induced bleaching of Euglena gracilis.J.Protozool. 9,373-374 (1962)

(27)Ebringer,L.:Side-effect of kanamycin on a green protista J.Antibiotics 15,113-114 (1962)

(28)Ebringer,L.:Bleaching of Euglena by antibiotics - a specific form of antagonism in Actinomycetes.Folia Microbiologica 9,249-255 (1964)

(29)Ebringer,L.:The action of nalidixic acid on Euglena gracilis.J.Gen.Microbiol. 61,141-144 (197o)

(3o)Ebringer,L.:The action of rubiflavin and other cytostatic antibiotics on Euglena gracilis.Neoplasma 19,579-589 (1972)

(31)Ebringer,L.Koska,R.,Macor,M.,Jurasek,A. und Kada,R.: Furan derivatives,their common melecular denominator responsible for bleaching of Euglena gracilis.Arch.Mikrobiol. 57,61-67 (1967)

(32)Ebringer,L.,Mego,J. und Jurasek,A.:Mitomycins and the bleaching of Euglena gracilis.Arch.Mikrobiol. 64,229-234 (1968)

(33)Ebringer,L.,Mego,J.,Jurasek,A. und Kada,R.:The action of streptomycin on the chloroplast system of Euglena gracilis.J.Gen.Mikrobiol. 59,2o3-2o9 (1969)

(34)Ebringer,L.,Nemec,P.,Santova,H. und Foltinova,P.:Changes of the plastid system of Euglena gracilis induced with streptomycin and dihydroxystreptomycin.Arch.Mikrobiol. 73,268-28o (197o)

(35)Edelmann,M.,Schiff,J.A. und Epstein,H.T.:Studies of chloroplast development in Euglena.XII Two types of satellite DNA.J.Mol.Biol. 11,769-774 (1965)

(36)Edmunds,L.N.:Replication of DNA und cell division in synchronously dividing cultures of Euglena gracilis.Science 145,266-268 (1964)

(37)Epps,H. und Gale:The influence of the presence of glucose during growth on the enzymatic activities of E.coli Biochem.Journal 36,619-623 (1942)

(38)Eshleman,J.N. und Danforth,W.F.:Some characteristics of ethanol metabolism in Euglena gracilis var. bacillaris. J.Protozool. 11,394-399 (1964)

(39)Freyssinet,G.:Ribosomal protein synthesis during chloroplast development of dark-grown Euglena gracilis.Proceedings of the Third International Congress on Photosynthesis,Rehovot,1731-1744 (1974)

(4o)Gibor,A. und Granick,S.:Ultraviolet sensitive factors in the cytoplasm,that affect the differentiation of Euglena plastids.J.Cell Biol. 15,599 (1962)

(41)Graves,L.B.:Effects of different substrates on glucose uptake and hexokinase activity in Euglena gracilis.J.Protozool. 18,543-546 (1971)

(42)Grob,E.C. und Rufener,J.:Influence of sugar containing nutrients on ultrstructure and photosynthesis activity of Spirodela oligorrhiza chloroplasts.Progress in Photosynthesis Research,Vol.I,55-62 (1969)

(43)Heinrich,B. und Cook,J.R.:Studies on the respiratory physiology of Euglena gracilis cultured on acetate or glucose.J.Protozool. 14,548-553 (1967)

(44)Hirota,Y.,Ryter,A. und Jacob,F.:Thermosensitive mutants of E.coli affected in the process of DNA synthesis and cellular division.Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 33,677-691 (1968)

(45)Hurlbert,R.E. und Bates,R.C.:Glucose utilization by Euglena gracilis var. bacillaris at higher pH.J.Protozool. 18,293-3o6 (1971)

(46)Hurlbert,R.E. und Rittenberg,S.C.:Glucose metabolism of Euglena gracilis var. bacillaris growth and enzymatic studies.J.Protozool. 9,17o-182 (1962)

(47)Ingle,J.:The effect of light and inhibitors on chloroplast and cytoplasmatic RNA-synthesis.Plant Phys. 43, 185o-1854 (1968)

(48)Itoh,M.,Izawa,S. und Shibata,K.:Disintegration of chloroplasts with dodecylbenzene sulfonate as measured by flattening effect and size distribution.Biochim.Biophys.Acta 69,13o-142 (1963)

(49)Jacob,F.,Brenner,S. und Cuzin,F.:On the regulation of DNA replication in bacteria.Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology 28,329 (1963)

(5o)Jagendorf,T.:Purification of chloroplasts by a density technique.Plant Phys. 3o,138-143 (1955)

(51)Jirovec,O.:Der Einfluß des Streptomycins und Patulins auf einige Protozoen.Experientia 5,74 (1949)

(52)Kirk,J.T.D.:Effect of streptomycin on greening and biosynthesis in Euglena gracilis.Biochim.Biophys.Acta 56, 139-151 (1962)

(53)Klein,S.M. und Vernon,L.P.:Protein composition of spinach chloroplasts and their photosystem I and photosystem II subfragments.Photochem.Photobiol. 19,43-49 (1974)

(54)Knippers,R. und Stratling,W.:The DNA replicating capacity of isolated E.coli cell wall-membrane complexes Nature 226,713 (197o)

(55)Lorenzen,H.:Die photosynthetische Sauerstoffproduktion von Chlorella bei langfristig intermittierender Beleuchtung.Flora (Jena) 147,382-4o4 (1959)

(56)Lorenzen,H.:Temperatureinflüsse auf Chlorella pyrenoidosa unter besonderer Berücksichtigung der Zellentwicklung. Flora 153,554-592 (1963)

(57)Luft,J.H.:Improvments in epoxy resin embedding methods. J.B.B.Cytol. 9,4o9 (1961)

(58)Lyman,H.:Specific inhibition of chloroplast-replication in Euglena gracilis by nalidixic acid.Plant Phys. 42,Suppl. s-27 (1967)

(59)Lyman,H.,Epstein.,H.T. und Schiff,J.A.:Studies of chloroplast development in Euglena;I Inactivation of green colony formation by UV-light.Biochim.Biophys.Acta 5o,3o1-3o9 (196o)

(6o)Lyman,H.,Epstein,H.T. und Schiff,J.A.:Studies of chloroplast development in Euglena;II Photoreversal of UV-inhibition of green colony formation.Biochim.Biophys.Acta 5o,31o-318 (196o)

(61)Mackiney,G.:Absorption of light by chlorophyll solutions J.Biol.Chem. 14o,315-322 (1941)

(62)Manning,J.E.,Wolstenhome,D.R.,Ryan,R.S.,Hunter,J.A. und Richards,O.C.:Circular chloroplast DNA from Euglena gracilis.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 68;1169-1173 (1971)

(63)Marcenko,E.:On the permanent bleaching of Euglena by chloramphenicol and its inhibition by cycloheximide.Cytobiol. 3,28o (1974)

(64)McCalla,D.R.:Effects of nitrofurans on the chloroplast system of Euglena gracilis.J.Protozool. 12,34-4o (1965)

(65)McCalla,D.R. und Baerg,W.:Action of myxin on the chloroplast system of Euglena gracilis.J.Protozool. 16,425-428 (1969)

(66)McCalla,D.R. und Reuvers,A.:Action of nitrofuran derivatives on the chloroplast system of Euglena gracilis. J.Protozool. 17,129 (197o)

(67)Mego,J.L. und Buetow,D.E.:Influence of cell division on the degree of streptomycin bleaching of Euglena gracilis J.Protozool. 13,2o-23 (1966)

(68)Ohad,I.,Eytan,G.,Jennings,R.C.,Goldberg,I.,Bar-Nun,S. und Wallach,D.:Biogenesis of chloroplast membranes in Chlamydomonas reinhardi.Reprint from IInd International Congress on Photosynthesis,Stresa,2563-2584 (1971)

(69)Palade,G.E.:A study of fixation for electron microscopy. J.Exp.Med. 95,285 (1952)

(70)Pogo,B.G.T. und Pogo,A.O.:Inhibition by chloramphenicol of chlorophyll and protein synthesis and growth in Euglena gracilis.J.Protozool. 12,96-1o1 (1965)

(71)Pringsheim,E.G. und Pringsheim,O.:Experimental elimination of chromatophores and eyespot in Euglena gracilis.New Phytologist 51,65 (1952)

(72)Provasoli,L.,Hutner,S.H. und Schatz:Streptomycin-induced chlorophyll-less races of Euglena.Proc.Soc.Exptl.Biol. Med. 69,279-282 (1948)

(73)Reynolds,E.S.:The use of lead citrate stain at hihgh pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J.Cell Biol 17,2o8 (1963)

(74)Richards,O.C.,Ryan,R.S. und Manning,I.E.:Effects of cyclo=heximide and of chloramphenicol on DNA synthesis in Eugle=na gracilis.Biochim.Biophys.Acta 238,19o-2o1 (1971)

(75)Robbins,W.J.,Hervey,A. und Stebbins,M.E.:Euglena and Vita=min B_{12}.Ann.New York Acad.Sci. 56,818-83o (1953)

(76)Rosen,W.G. und Gawlik,St.R.:Effect of streptomycin on chloroplast accumulation in Euglena gracilis.J.Protozool. 8,9o-96 (1961)

(77)Ruppel,H.G.:Untersuchung über die Zusammensetzung von Chlorella bei Licht-Dunkel-Wechsel.Flora (Jena) 152,113--138 (1962)

(78)Schiff,J.A.:The development,inheritance and origin of the plastid in Euglena.
in:Advances in Morphogenesis,Vol. 1o,eds.M.Abercrombie und J.Brachet,Acad.Press,N.Y.,265 (1973)

(79)Schiff,J.A.:The control of chloroplast differentiation in Euglena.Proceedings of the Third International Con=gress on Photosynthesis,Rehovot,1691-1717 (1974)

(8o)Schmidt,G. und Lyman,H.:Photocontrol of chloroplast enzy=me synthesis in mutant and wild-type Euglena gracilis. Proceedings of the Third International Congress on Photo=synthesis,Rehovot,1755-1764 (1974)

(81)Schwartzbach,S.D.,Freyssinet,G. und Schiff,J.A.:The chlo=roplast and cytoplasmic ribosomes in Euglena.Plant Phys. 53,533-542 (1974)

(82)Shapiro,A.L.,Vinuela,E. und Maizel,J.V.:Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamid gels.Biochem.Biophys.Res.Commun.28,815 (1967)

(83)Siegesmund,K.A.,Rosen,W.G. und Gawlik,St.R.:Effects of darkness and of streptomycin on the fine structure of Euglena gracilis.Am.J.Botany 49,137-145 (1962)

(84)Smarda,J.,Ebringer,L. und Mach,J.:The effect of colicin E2 on the flagellate Euglena gracilis.J.Gen.Microbiol. 86,363-366 (1975)

(85)Stutz,E. und Vandrey,J.P.:Euglena gracilis chloroplast DNA:some structural and functional aspects.Reprint from the 2nd International Congress on Photosynthesis,Stresa, 26o1-26o9. (1971)

(86)Ternetz ,C.:Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Euglena gracilis Klebs.Jahr.wiss.Bot. 51,435 (1912)

(87)Thornber,J.P.,Gregory,R.P.F.,Smith,C.A. und Bailey,J.L.: Studies on the nature of the chloroplast lamella.I.Preparation and some properties of two chlorophyll-protein complexes.Biochemistry 6,391-396 (1967)

(88)Tong,N.C.H.L.,Gross,J.A. und Jahn,T.L.:Streptomycin- and pyribenzamine-induced chlorosis in Euglena.J.Protozool. 12,153-159 (1965)

(89)Uzzo,A. und Lyman,H.:Light dependence of temperatur-induced bleaching of Euglena gracilis.Biochim.Biophys.Acta 18o, 573-575 (1969)

(9o)Uzzo,A. und Lyman,H.:The nature of the chloroplast genome of Euglena gracilis.Reprint from IInd International Congress on Photosynthesis,Stresa,2585-2599 (1971)

(91)Vavra,J.:The action of streptomycin on chloroplasts of the flagellate Euglena gracilis Klebs.Folio Biologica Tom III,Fasc.2,1o8-113 (1957)

(92)Wanka,F.:Über den Einfluß des Lichts auf die Nukleinsäuresynthese bei Synchronkulturen von Chlorella pyrenoidosa.Ber.deutsch.Bot.Gesell. 75,457-464 (1962)

(93)Wanka,F.:Über die Induktion der Zellteilung in synchronen Chlorella-Kulturen.Planta 79,65-76 (1968)

(94)Wanka,F. und Poels,C.L.M.:On the problem of an enzymatic regulation of DNA synthesis in Chlorella.Europaen.J.Biochem. 9,478-482 (1969)

(95)Weber,K. und Osborne,M.:The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.J.Biol.Chem. 244,4406 (1969)

(96)Zahalsky,A.C.,Hutner,S.H.,Keane,M. und Burge,R.M.:Bleaching Euglena with antihistamines and streptomycin-type antibiotics.Arch.Mikrobiol. 42,46-55 (1962)

(97)Zumstein,H.:Zur Morphologie und Physiologie der Euglena gracilis Klebs.Jahr.wiss.Bot. 34,149-198 (1900)

Meinem verehrten Lehrer,Herrn Prof.Dr.W.Wießner,danke ich für die Überlassung des Themas sowie für das stete Interesse,das er dem Fortgang der Arbeit entgegenbrachte.

Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz unterstützt.

Lebenslauf

Peter Brandt, geboren am 27.8.1946 in Bernburg/Saale als Sohn des Rechnungsrevisors Hermann Brandt und seiner Ehefrau Käthe, geb. Rausch

1953-1957	Besuch der Ernst-August-Schule in Helmstedt
1957-1966	Besuch des Julianums (math.-naturwissenschaftliches Gymnasium für Jungen) in Helmstedt
Febr. 1966	Ablegung des Abiturs
April-Sept. 1966	Praktikum (Techn. Betrieb)
Okt. 1966-Febr. 1968	Grundwehrdienst bei der Bundeswehr
SS 1968	Beginn des Studiums der Biologie in Göttingen
WS 1969/70	Ablegung der Diplom-Vorprüfung in den Fächern Botanik, Zoologie und Chemie; wegen Zulassungsbeschränkungen für das Physikpraktikum erfolgte die Prüfung in Physik später
26.4.1971	Ablegung der Diplom-Vorprüfung (Physik)
15.6.1973	Ablegung der Diplom-Hauptprüfung (Botanik, Mikrobiologie, Chemie)
Herbst 1973--Herbst 1975	Durchführung der Arbeit für die vorliegende Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Wießner am Pflanzenphysiologischen Institut der Georg-August-Univerität in Göttingen

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Amelunxen, Ax, Birukow, Brockmann, Ellenberg, Feierabend, Fischer, Flammersfeld, Funke, Galling, Glemser, Gottschalk, Graebe, Heberer, Hilsch, Jacobi, Jost, Koch, Kuhl, Lorenzen, Pfennig, Piepho, Pirson, Rensing, Richtering, Schlegel, Schlote, Wagenitz, Wießner, Ziechmann